SYNTHESE UND BIOLOGISCHE WIRKUNG POTENTIELL ALKYLIERENDER DERIVATE DES K-STROPHANTHIDINS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

PETRA HERRMANN

aus

BONN

BONN 1980

SYNTHESE UND BIOLOGISCHE WIRKUNG POTENTIELL ALKYLIERENDER DERIVATE DES K-STROPHANTHIDINS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

PETRA HERRMANN

aus

BONN

BONN 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

angefertigt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Bonn

Referent : Prof. Roth, Bonn
Coreferent : Prof. Klaus, Köln

Tag der Promotion : 14.2.1980

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2.	METHODE	1o
2.1.	Chemie	1o
2.1.1.	Reagentien	1o
2.1.2.	Dioxan- und Pyridinreinigung	1o
2.1.3.	Dünnschichtchromatographie	1o
2.1.4.	Säulenchromatographie	11
2.1.5.	Schmelzpunktbestimmung	11
2.1.6.	NMR-, IR-, Massenspektroskopie	11
2.1.7.	Synthesen der Strophanthidinderivate	11
2.1.7.1.	Allgemeines	11
2.1.7.2.	Strophanthidin-(3ß-2'-bromacetat)	13
2.1.7.3.	Strophanthidin-(3ß-2'-brompropionat)	14
2.1.7.4.	Strophanthidin-(3ß-3'-brompropionat)	15
2.1.7.5.	Strophanthidin-(3ß-2'-bromcapronat)	17
2.1.7.6.	Strophanthidin-(3ß- propionat)	17
2.1.7.7.	Strophanthidin-(3ß- capronat)	18
2.1.8.	Verteilungskoeffizient	19
2.1.9.	Umsetzung der Strophanthidinderivate mit Sulfhydrylgruppen (Cystein)	2o
2.2.	Prüfung der Strophanthidinderivate an isolierten Papillarmuskeln von Meerschweinchenherzen	21
2.2.1.	Lösungen	21
2.2.2.	Versuchsdurchführung	22
2.2.3.	Anflut- und Auswaschkinetik des inotropen Effektes	22
2.2.4.	Anflut- und Auswaschkinetik des toxischen Effektes (Kontraktur)	23

2.3.	Prüfung der Strophanthidinderivate an der myokardialen Na^+-K^+-ATPase	24
2.3.1.	Lösungen	24
2.3.2.	Präparation der mikrosomalen Na^+-K^+-ATPase	24
2.3.3.	Messung der ATPase-Aktivitäten	25
2.3.4.	Reversibilität der Na^+-K^+-ATPase-Hemmung	27
2.3.4.1.	Lösungen	27
2.3.4.2.	Versuchsdurchführung	27
2.4.	Proteinbestimmung	28
2.5.	Statistik	3o
3.	ERGEBNISSE	31
3.1.	Verteilungskoeffizient	31
3.2.	Umsetzung mit Sulfhydrylgruppen (Cystein)	31
3.3.	Wirkung der halbsynthetischen Strophanthidinderivate auf den Meerschweinchenpapillarmuskel	36
3.3.1.	Dosis-Wirkungsbeziehung	36
3.3.2.	Anflut- und Auswaschkinetik des positiv inotropen Effektes	49
3.3.3.	Anflut- und Auswaschkinetik des toxischen Effektes (Kontraktur)	55
3.4.	Einfluß der Strophanthidinderivate auf die mikrosomale Na^+-K^+-aktivierbare ATPase	6o
3.4.1.	Dosis-Wirkungsbeziehung	6o
3.4.2.	Reversibilität der ATPase-Hemmung	67
4.	DISKUSSION	69
4.1.	Einfluß der Seitenkettenverlängerung am C_3 des Strophanthidingerüstes auf die Lipophilie	69

4.2. Wirkung der Strophanthidinderivate am isolierten Meerschweinchenpapillarmuskel 7o

4.3. Na^+-K^+-ATPase-Hemmung durch potentiell-alkylierende, bromsubstituierte Strophanthidinderivate und ihre nicht-bromierten Analoga und die Reversibilität des cardenolid-induzierten Effektes 74

4.4. Schlußbetrachtung 78

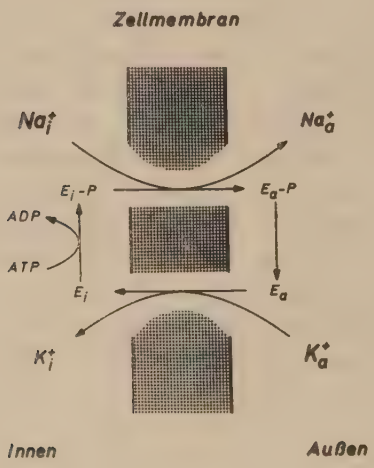
5. ZUSAMMENFASSUNG 81

6. LITERATURVERZEICHNIS 85

Einleitung und Fragestellung

Während die Kontraktionskraft-steigernde Wirkung der Herzglykoside schon fast zwei Jahrhunderte therapeutisch genutzt wird, blieben die biochemischen Grundlagen dieser Wirkung weitgehend ungeklärt. Zunächst wurde ein direkter Angriff der Digitaloide auf den myokardialen Energiestoffwechsel und das kontraktile System angenommen; seit mehr als 2o Jahren steht jedoch der Einfluß der herzwirksamen Glykoside auf den Elektrolytstoffwechsel im Mittelpunkt der Untersuchungen, nachdem SCHATZMANN (1953) erstmals die Hemmung des K^+- Transportes durch Herzglykoside an der Erythrocytenmembran beschrieb. Das Herzmuskelgewebe hat, wie alle anderen erregbaren Strukturen, eine ungleiche Elektrolytverteilung zwischen Intra- und Extrazellulärraum; d.h. die K^+-Konzentration im Zellinnern ist wesentlich höher als im Extrazellulärraum, umgekehrt verhält sich die Verteilung der Na^+-Konzentrationen. Durch diese Konzentrationsdifferenzen wird ein Membranruhepotential ausgebildet, das durch "passive" Ionenverschiebungen während des Aktionspotentials gestört werden kann. Die intakte Zelle vermag diese Änderungen des Ionengradienten durch "aktive" Transportvorgänge auszugleichen, die Homöostase wird wieder hergestellt. Ein Enzymsystem, das für den "aktiven" Transport von Na^+-Ionen aus dem Intrazellulärraum und K^+-Ionen aus dem Extrazellulärraum gegen ein Konzentrationsgefälle verantwortlich ist, wurde von SKOU (1957) erstmals aus Nervenhomogenaten der Küstenkrabbe isoliert und später in verschiedenen anderen Gewebearten (z.B. Erythrocytenmembran, Hirn, Niere, Skelettmuskel, Herz) gefunden (POST et al. 196o, DUNHAM und GLYNN 1961, SCHWARTZ 1962. REPKE und PORTIUS 1963).Die Energie für den "aktiven Transport wird aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und Monophosphat (Pi) gewonnen. Die Na^+-K^+-Pumpe wurde als ATPase (=Adenosintriphosphathydrolase, E.C. 3.6.1.3.) bezeichnet.

Zur Aktivierung der Na^+-K^+-ATPase ist die Anwesenheit von Mg^{2+}-Ionen im Medium unbedingt erforderlich. Der Zusatz von K^+-Ionen zu dem Mg^{2+}-haltigen Inkubationsmedium hat keinen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms, während die alleinige Zugabe von Na^+-Ionen das Enzym geringfügig aktiviert. Gleichzeitige Anwesenheit von Na^+- und K^+-Ionen führt zu einem weiteren Anstieg der Aktivität. Wird die K^+-Konzentration bei konstanter Na^+-Konzentration erhöht, so erreicht die Aktivität des Enzyms bei 3o-4o mM K^+ ein Maximum und geht dann bei weiterer Konzentrationssteigerung in eine Hemmung über (SKOU 196o).
Calciumionen hemmen die Na^+-K^+-ATPase schon in sehr geringen Konzentrationen (o.o1 mM). Diese Hemmung kann durch Mg^{2+}- und Na^+-Ionen antagonisiert werden (PORTIUS und REPKE 1967). Der aktivierende Effekt von Na^+-Ionen auf die Na^+- K^+-ATPase kann nicht durch andere monovalente Kationen ausgelöst werden, während eine Steigerung der Aktivität durch K^+-Ionen auch mit Rb^+, Tl^+, NH_4^+, Cs^+ und Li^+ erreicht werden kann (SKOU 1965).
Die Funktion dieses Enzymsystems, das für den "aktiven" Ionentransport durch die Zellmembran verantwortlich ist, wird in dem folgenden Schema veranschaulicht:



Im nicht-phosphorylierten Zustand (E_i) des Enzyms befinden sich an der Innenseite der Membran Bindungsstellen mit hoher Affinität für Na^+-Ionen. Bei Anwesenheit von Mg^{2+} findet dort eine Obertragung des endständigen ATP-Phosphatrestes auf das Enzym statt. Die Folge dieser Phosphorylierung ist eine Konformationsänderung (E_i-P $\longrightarrow$ E_a-P) womit gleichzeitig ein Transport von Na^+ auf die Außenseite der Membran verbunden ist. Umgekehrt liegt auf der Außenseite der Zellmembran eine erhöhte Affinität für K^+ vor. K^+ führt zu einer Dephosphorylierung des Enzyms (E_a-P $\longrightarrow$ E_a+P_i). Mit dem Obergang in den ursprünglichen Konformationszustand ($E_a \longrightarrow E_i$) ist der Transport von K^+ auf die Innenseite der Zellmembran verknüpft. Im Intrazellulärraum liegt nun wieder eine höhere Affinität für Na^+ vor, der Zyklus kann von neuem beginnen (KLAUS 1971).

Herzglykoside hemmen sehr spezifisch die Na^+-K^+-ATPase (Transport-ATPase) und damit den aktiven Ionentransport. Sie haben jedoch keinen Einfluß auf die Mg^{2+}-abhängige ATPase (Basal-ATPase) (SKOU 196o). Die Entdeckung einer Na^+-K^+-aktivierbaren ATPase in Herzmuskelzellen von Warmblütlern (s.o.) führte zu der Hypothese, daß die ATPase der spezifische Rezeptor der herzwirksamen Substanzen ist, und daß deren cardiotone und cardiotoxische Wirkung durch eine Hemmung des Enzymsystems hervorgerufen wird. Da der positiv inotrope Effekt der Herzglykoside nicht allein durch die Hemmung der ATPase und die dadurch ausgelöste Elektrolytverschiebung erklärt werden konnte, andererseits der Einfluß von Ca^{2+}-Ionen auf das kontraktile System im Rahmen der elektromechanischen Kopplung bekannt war, wurde die Wirkung von Herzglykosiden auf den myokardialen Calciumhaushalt untersucht.

Das Prinzip der elektromechanischen Kopplung besteht darin, daß während einer bestimmten Phase des Erregungsablaufes, durch Ausbreitung der Erregung von der Plasmamembran über die Einstülpungen

des transversal tubulären Systems (T-System) auf das longitudinale System eine Freisetzung von Ca^{+} aus den intrazellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum) bewirkt wird.Durch den Anstieg der freien Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma wird der kontraktile Apparat konzentrationsabhängig aktiviert. Gleichzeitig werden die Transportsysteme für die Elimination von Ca^{2+} aus dem zytoplasmatischen Raum stimuliert, womit eine erhöhte energiebedingte Aufnahme ins endoplasmatische Retikulum und ein vermehrter carriervermittelter Auswärtsstrom durch die Membran verbunden ist. Die Abnahme der freien intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration bewirkt die Erschlaffung des Muskels (EBASHI und ENDO 1968). Der Angriffspunkt der Herzglykoside in dem beschriebenen Zyklus konnte noch nicht exakt lokalisiert werden, ihre therapeutische Wirkung wird jedoch auf eine Mobilisation von gebundenem, normalerweise nicht-austauschbarem Calcium bei sonst konstantem Gesamt-Ca^{2+}-Gehalt der Herzmuskelzelle zurückgeführt (KLAUS 1971).

Der Einfluß der Herzglykoside auf den Na^{+}-K^{+}-Elektrolythaushalt und den Ca^{2+}-Haushalt der Zelle führte zu verschiedenen Theorien über einen möglichen Wirkungsmechanismus der Digitaloide.

AKERA und BRODY (1978) erweiterten die Vorstellung von REPKE und PORTI (1963), wonach die Kontraktionskraft-steigernde Wirkung der Herzglykoside auf einer Hemmung der Na^{+}-K^{+}-aktivierbaren ATPase beruht. Die Pumpenaktivität des Enzyms wird verringert und dadurch die intrazelluläre Natriumkonzentration gesteigert. Die erhöhte Na_i^{+}-Konzentration bewirkt über die Aktivierung eines Ca^{2+}-Carriersystems einen vermehrten Calciumeinstrom, der zu einer Kontraktionssteigerung führt.

Nach SCHWARTZ (1976) liegt eine allosterische Hemmung der Na^{+}-K^{+}-ATPase durch Herzglykoside vor.Sie greifen die ATPase an einer spezifischen Stelle an der Außenseite der Membran an und bewirken so eine Konformationsänderung. Dadurch können die Substrate (ATP, Na^{+}, K^{+}) schlechter gebunden werden. Das Enzym wird

gehemmt und die daraus resultierende Steigerung der intrazellulären Natriumkonzentration führt zu einer vermehrten Freisetzung von Membran-gebundenem Calcium, das seinerseits eine verbesserte Kontraktilität zur Folge hat.

Basierend auf Untersuchungen von POST et al. (1969) stellten LÖLLMANN und PETERS (1978) die Hypothese auf, daß Herzglykoside nur an einen spezifischen Konformationszustand der ATPase gebunden werden, der während des Na^+-K^+-Transportzyklus auftritt. Die Bildungshäufigkeit des Cardenolid-Enzym-Komplexes ist nicht nur von der Konzentration der Herzglykoside, sondern auch von der Konzentration dieses Konformationszustandes abhängig. Durch die Bindung der Herzglykoside wird dieser Konformationszustand erhalten, und dadurch die Pumpenaktivität gehemmt. Die Ca^{2+}-Freisetzung, die durch diese Konformationsänderung im Plasmalemm (Zellmembran) und nicht wie sonst angenommen, im endoplasmatischen Retikulum erfolgen soll, führt schließlich wieder zu Steigerung der Kontraktionskraft.

Nach KLAUS und FRICKE (1978) schließlich ist diese Bildung des Cardenolid-ATPase-Komplexes mit einem Transport der Herzglykoside in das Zellinnere verbunden. Durch Bindung der Herzglykoside an die phosphorylierte Zwischenform des Enzym an der Außenseite der Membran (E_a-P) wird der Konformationszustand der ATPase bei Anwesenheit von Na^+ geändert, wodurch eine Translokation der Herzglykoside in ein inneres Kompartiment stattfinden kann. Im Zellinnern liegen die Herzglykoside in freier und gebundener Form vor. Der freie Anteil bewirkt eine "Mobilisierung" des fest-gebundenen Calciums im endoplasmatischen Retikulum, wodurch bei der Erregung der Zellmembran vermehrt Ca^{2+} freigesetzt werden kann (s.o.). Durch die Erhöhung der freien Calciumfraktion kommt es zu einer Aktivierung des kontraktilen Systems, d.h. zur positiv inotropen Wirkung.

Wie die vorangegangenen Ausführungen zeigen, bestehen zwei verschiedene Auffassungen über die Interaktion von Herzglykosiden mit

der Na^+-K^+-ATPase:
1) die ATPase wird durch Herzglykoside in ihrer Aktivität nur gehemmt,
2) das Enzym übernimmt gleichzeitig den Transport der Herzglykoside auf die Innenseite der Membran.
Eine Differenzierung zwischen diesen beiden Hypothesen ist nur durch Charakterisierung des Wirkortes der Herzglykoside und durch Strukturaufklärung der spezifischen Bindungsstellen möglich.

DUTTA et al. (1968) und FRICKE et al. (1969) versuchten mit verschiedenen radioaktiv-markierten Herzglykosiden die spezifische Bindungsstelle dieser Pharmaka zu lokalisieren. Sie fanden eine erhöhte Bindung der Herzglykoside an intrazellulären Strukturen, besonders in den Mikrosomen und im sarkoplasmatischen Retikulum. Durch die präparative Aufarbeitung (Differentialzentrifugation, Homogenisation) kann es jedoch zu Um- und Rückverteilungsphänomenen kommen, die das Ergebnis verfälschen können. Eine Möglichkeit, diese präparationsbedingte Fehlerquelle zu beseitigen, wäre, Herzglykoside irreversibel an den Rezeptor zu binden. Auf der Suche nach einem "affinity label" der Na^+-K^+-ATPase, d.h. einem Analogon der Herzglykoside mit derselben Affinität zum Rezeptor und der Fähigkeit mit den nucleophilen Aminosäuregruppen des Rezeptors kovalente Bindungen einzugehen, synthetisierte HOKIN (1966) Strophanthidin-3β-halo-acetate als potentielle Alkylantien. Dieser und andere Versuche (RUOHO und HOKIN 1968, ABRAMSON und CHO 1971, FRICKE und KLAUS 1969, ROTH-SCHECHTER et al. 1970, TOBIN et al. 1973, PETERS et al. 1974, TOBIN und ABRAMSON 1975) verliefen bisher unbefriedigend, da die myokardiale Na^+-K^+-ATPase nicht irreversibel gehemmt werden konnte.

TOBIN und ABRAMSON (1975) versuchten dieses Ergebnis dadurch zu erklären, daß die Steroid-haloacetate einerseits zwar die cardiotonen Bindungsstellen besetzen, anderseits die Alkylierung aber nur an Rezeptorstellen mit niedriger Spezifität stattfinden soll. Ursache dafür kann einmal die geringe chemische Reaktivität des

Rezeptors sein (TOBIN und ABRAMSON 1975), zum andern eine ungenügende Näherung der alkylierenden Gruppe an die entsprechende Bindungsstelle (YODA 1973).

Durch wesentlich reaktivere, photoaktivierte Substanzen, konnte die geringe Reaktionsfähigkeit des Rezeptors umgangen werden ("photoaffinity labeling") (TOBIN et al. 1975, TOBIN et al. 1976), und es gelang,eine teilirreversible Hemmung der ATPase (ca. 35%) zu erreichen. Durch Gel-Elektrophorese (RUOHO und KYTE 1974, FORBUSCH III et al. 1978) wurde gezeigt, daß die Na^+-K^+-ATPase aus einem großen (Mol.Gew. = 95ooo) und einem kleinen Polypeptid (Mol.Gew. = 12ooo) besteht, und die Cardenolide mit Bindungsstellen der großen Untereinheit spezifisch reagieren. Ein Nachteil des "photoaffinity labeling" ist, daß die Verknüpfungsstelle des Cardenolids mit dem Rezeptor nicht vorhersehbar ist, und es somit unmöglich wird, die an der Bindung beteiligten Aminosäuren zu identifizieren.

Eigene Versuche gingen von der Überlegung aus, Substanzen zu synthetisieren, bei denen durch Strukturveränderung eine weitere Annäherung an die Bindungsstelle ermöglicht wird, so daß sich kovalente Bindungen leichter ausbilden können. Es wurde die Hypothese von PORTIUS und REPKE (1964) zu Grunde gelegt, die das Herzglykosidmolekül nach Wirk-, Haft- und Hilfsgruppe unterschieden. Die "Wirkgruppe" ist durch eine mit einer C=C-Doppelbindung konjugierte Carbonylgruppe gekennzeichnet, d.h. im speziellen Fall der Digitaloide durch den ungesättigten Laktonring. Nähert sich das Cardenolid dem Rezeptor, kommt es über den Laktonring zu einer "Einpunktanheftung" durch Wasserstoffbrückenbildung. Der Steroidrest wird als "Haftgruppe" definiert. Durch die freie Drehbarkeit um C_{17} - C_{2o} lagert er sich an den komplementären Rezeptorteil des Enzyms an und begünstigt eine "Mehrpunktanheftung" durch die Ausbildung hydrophober Bindungen. Der Zuckerrest hat nach REPKE nur die Funktion einer "Hilfsgruppe", die als polarer Rest die unspezifische Bindung der Glykoside an Eiweiße und Lipoide zurückdrängt, und die spezifische

Fixierung an den Rezeptor fördert.

WILSON et al. (1970) erweiterte diese Vorstellung,indem er auch dem Zuckeranteil eine spezifische Bedeutung für die Affinität der Cardenolide zum Rezeptor beimaß. YODA (1973) und ERDMANN und SCHONER (1974) bestätigten diese Beteiligung der Zuckerkomponente an der Enzym-Cardenolid-Bindung: in enzymatischen Untersuchungen verglichen sie die Dissoziationsgeschwindigkeit von Enzym-Glykosid- und Enzym-Aglykon-Komplexen. Dabei ergaben sich höhere Dissoziationsraten bei den Enzym-Aglykon-Komplexen, was auf eine geringere "Haftung" des Aglykons am Rezeptor zurückgeführt wurde.

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollten Strophanthidinderivate synthetisiert werden, deren Hydroxylgruppe am C_3-Atom des Steroidgerüstes mit verschiedenen Carbon- und Bromcarbonsäuren verestert ist. Mit Hilfe dieser halbsynthetischen Strophanthidinderivate sollte anschließend an entsprechenden biologischen Modellen (z.B. isolierter Papillarmuskel, Na^+-K^+-ATPase) geprüft werden, ob die Kettenverlängerung im Sinne der "Hilfsgruppe" nach PORTIUS und REPKE (1964) eine bessere Anlagerung (Bindung) an den Rezeptor zur Folge hat und damit die Reaktion der alkylierenden Gruppe (Brom) mit den nucleophilen Gruppen des Rezeptors erleichtert.

Im Vordergrund der Untersuchungen standen zunächst die "alkylierenden" Eigenschaften der synthetisierten Derivate. Diese sollten einmal durch Umsetzung mit Cystein (in vitro Test) zum andern durch Reaktion mit der Na^+-K^+-ATPase charakterisiert werden, um einen Hinweis auf die mögliche Verwendung als "affinity label" zu erhalten. Zeitverlaufskurven der positiv inotropen und der toxischen Wirkung der synthetisierten Strophanthidinderivate sollten diese Untersuchungen ergänzen, um so zwischen einer Korrelation oder Dissoziation von Enzymhemmung und biologischer Wirkung differenzieren zu können. Ein möglicherweise bestehender Zusammenhang zwischen positiv inotropem Effekt und der Hemmung der myokardialen Transport-ATPase sollten schließlich durch Dosis-

Wirkungs-Kurven der Strophanthidinderivate am isolierten Meerschweinchenpapillarmuskel und einer Na^+-K^+-ATPase aus Meerschweinchenherzen geklärt werden.

2. METHODE

2.1. Chemie

2.1.1. Reagentien

Strophanthidin-3ß-acetat wurde freundlicherweise von Herrn Priv. Doz. Dr. U.Fricke zur Verfügung gestellt.
Für die Herstellung der Carbonsäureester des Strophanthidins wurde Strophanthidin der Fa. Boehringer Mannheim verwendet.
Die Carbonsäurebromide und -anhydride wurden von der Fa. Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2. Dioxan- und Pyridinreinigung

Das zur Synthese verwendete Dioxan bzw. Pyridin wurde über metall. Natrium destilliert und über KOH aufbewahrt.

2.1.3. Dünnschichtchromatographie

a) Platten
Für die qualitative DC wurden Kieselgel 6o Fertigplatten der Fa. Merck (Darmstadt) verwendet, die eine Schichtdicke von o.25 mm aufwiesen.

b) Nachweismethoden
Der ungesättigte Laktonring der Cardenolide wurde mit 3,5-Dinitrobenzoesäure im alkalischen Milieu nachgewisen (LEWBERT 1963).
Reagenz nach Kedde: Lösung A - 3,5-Dinitrobenzoesäure/MeOH
Lösung B - KOH/MeOH

c) Fließmittel
Für die qualitative DC wurden folgende Fließmittel benutzt:
Fließmittel I = Aceton : MeOH : $CHCl_3$: H_2O = 2o : 14 : 64 : 2
Fließmittel II = $CHCl_3$: MeOH = 95 : 5

2.1.4. Säulenchromatographie

a) Füllmittel

Die Säulen (Länge 8o cm; Durchmesser 2.5 cm) wurden mit Kieselgel 6o, Merck (Darmstadt) bzw. Sephadex LH_{2o}, Fa. Pharmacia (Schweden) gefüllt.

b) Fließmittel

Für die Säulenchromatographie wurden folgende Fließmittel benutzt:
Fließmittel III = Aceton : MeOH : $CHCl_3$: H_2O = 2o : 14 : 64 : 2
Fließmittel IV = Toluol : $CHCl_3$: MeOH = 84 : 1o : 6

2.1.5. Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Schmelzpunktapparat der Fa. Büchi (Schweiz) bestimmt.

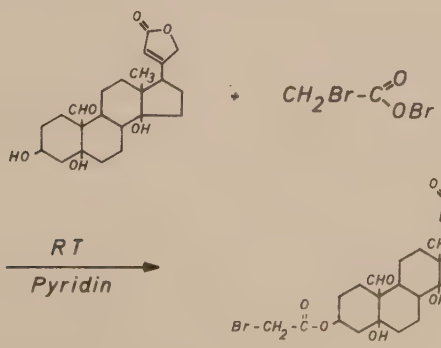
2.1.6. NMR-, IR-, Massenspektroskopie

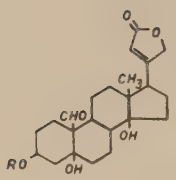
Für die Anfertigung der NMR- und IR-Spektren im Pharmazeutischen Institut in Bonn, und der Massenspektren im Institut für anorganische Chemie in Köln möchte ich mich hiermit bedanken.

2.1.7. Synthesen der Strophanthidinderivate

2.1.7.1. Allgemeines

Strophanthidin wurde in wasser-freiem Dioxan gelöst und mit den entsprechenden Säurebromiden oder Säureanhydriden bei Raumtemperatur unter Rühren verestert, wobei überschüssiges Bromid oder Säure als Pyridinumsalz aufgefangen wurde.





R	=	H-	k-Strophanthidin (STR)
R	=	CH_3CO-	Strophanthidin -(3ß - acetat) (SA)
R	=	CH_3CH_2CO-	Strophanthidin -(3ß - propionat) (SP)
R	=	$CH_3(CH_2)_4CO$-	Strophanthidin -(3ß - capronat) (SC)
R	=	$BrCH_2CO$-	Strophanthidin -(3ß - bromacetat) (SBA)
R	=	$CH_3CHBrCO$-	Strophanthidin -(3ß - 2'-brompropionat) (α-SBP
R	=	$BrCH_2CH_2CO$-	Strophanthidin -(3ß - 3'-brompropionat) (ß-SBP
R	=	$CH_3(CH_2)_3CHBrCO$-	Strophanthidin -(3ß - 2'-bromcapronat) (SBC)

Abb.1

Übersicht über die untersuchten Strophanthidinderivate

Der Reaktionsablauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt, und nach Beendigung der Umsetzung mit Wasser gestoppt. Durch eine Chloroform/Wasser Trennung und anschließender Einengung der Chloroformphase am Rotationsverdampfer (Rotavapor, Fa. Büchi, Schweiz) wurde das Rohprodukt gewonnen.Dieses wurde säulenchromatographisch (unter DC-Kontrolle) gereinigt, nach Entfernung des Fließmittels aus n-Heptan/Aceton umkristallisiert und im Exsikkator über $CaCl_2$ getrocknet.

Die Struktur der Produkte wurde durch NMR-, IR-, und Massenspektroskopie mit Molekulargewichtsbestimmung überprüft.

2.1.7.2. Strophanthidin-(3ß-2'-bromacetat) (SBA)

Das Derivat wurde modifiziert nach HOKIN et al.(1966) synthetisiert; 5oo mg (1.24 mmol) Strophanthidin und o.42 ml (5.2 mmol) Pyridin wurden in Dioxan gelöst, mit o.46 ml (5.2 mmol) Bromacetylbromid versetzt und 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Umsetzung wurde die Reaktion durch Zugabe von 5o ml H_2O beendet.

Das H_2O/Dioxan-Gemisch wurde am Rotationsverdampfer fast bis zur Trockene eingeengt und das Rohprodukt durch H_2O-Zugabe ausgefällt. Das Lösungsmittel wurde abgesaugt und das Produkt über $CaCl_2$ getrocknet. Dünnschichtchromatographisch erwies sich das Produkt als einheitlich und der Nachweis nach Kedde war positiv.
Ausbeute : 8o%
Fp : 188 - 192°C (Braunfärbung) Lit. Angabe (HOKIN et al.1966) = Fp : 19o - 194°C
Masse: M^+ bei m/e 5o7 ($C_{25}H_{33}BrO_7$ - H_2O)
NMR : 2o mg in D-Chloroform ($CDCl_3$)
Signal für den ungesättigten Laktonring
δ 4.95/ δ 5.95 ppm (Lit. δ 4.84/ δ 5.77 ppm)
Signal für die Estergruppierung
δ 5.3o ppm (Lit. δ 6.16 ppm)

Signal für endständiges CH_2 δ 4.o ppm
Signal für Methylgruppe am C_{18} δ o.9 ppm
(Lit. δ o.85 ppm)
Das Steroidgerüst kommt im Multiplet zwischen
δ 2.5 - o.65 ppm
Die Aldehydgruppierung findet sich bei δ 1o.2 ppm
(Lit. δ 1o.o ppm)

IR : 326o - 36oo mittelstarke breite Bande mit Spitze bei
352o für Wasserstoffbrückenbindung und OH
294o breite Bande für tertiäre Methylgruppe mit Spitze
bei 286o für die Aldehydgruppe
18oo - 172o starke und breite Bande für das ß-ungesättigte
Lakton und α-Halogen
163o Bande für die C=C-Doppelbindung (Lakton)
53o schwache breite Bande mit Spitze für Bromid

2.1.7.3. Strophanthidin-(3ß-2'-brompropionat) (α-SBP)

Das Derivat wurde in Anlehnung an die Methode von HOKIN et al. (1966) hergestellt.

5oo mg (1.24 mmol) Strophanthidin und o.63 ml (7.8 mmol) Pyridin wurden in Dioxan gelöst und mit o.81 ml (7.8 mmol) 2-Brompropionylbromid versetzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit (4.5 Stunden) bei Raumtemperatur erfolgte die Aufarbeitung und Reinigung mit Hilfe einer mit LH_{2o} gefüllten Säule und Fließmittel III.
Das erhaltene Produkt war DC-einheitlich und die Reaktion nach Kedde positiv.
Ausbeute : ca. 5o%
Schmelzpunkt : 16o°C
Masse : M^+ bei m/e 521 ($C_{26}H_{35}BrO_7$ - H_2O)
NMR : Die Signale für das Steroidgerüst verlaufen wie oben beschrieben (siehe SBA)
Die -CH-Gruppe hat ein Quartett bei δ 4.4o ppm
Die endständige Methylgruppe zeigt ein Signal δ 1.2o ppm

IR : Mittelstarke, breite Bande bei 328o - 36oo für Wasserstoffbrückenbindung und OH

Mittelstarke Bande bei 294o für tertiäre Methylgruppe
mit Sattel bei 287o für Aldehydgruppe
Starke Bande mit Spitze bei 173o für Laktonring und
α -Halogenid
Mittelstarke, schmale Bande bei 164o für C=C-Doppelbindung
Breite und schwache Bande mit Spitze bei 53o für Bromid

2.1.7.4. Strophanthidin-(3ß-3'-Brompropionat) (ß-SBP)

I. Brompropionsäurebromid

15 g (1o mmol) 3-Brompropionsäure und 1o g (18 mmol) Phosphortribromid wurden unter Rückfluß auf dem Ölbad bei 11o°C 2o - 24 Stunden erhitzt. Nach fraktionierter Vakuumdestillation wurde als Hauptfraktion 3-Brompropionsäurebromid mit einem Siedepunkt von 72 - 76°C bei 2o Torr erhalten.

II. Strophanthidin-3ß-3'-Brompropionat

3oo mg (o.75 mmol) Strophanthidin und o.5 ml (6.2 mmol) Pyridin wurden in 3o ml Dioxan gelöst und mit o.65 ml (6.2 mmol) 3-Brompropionsäurebromid versetzt und bei Raumtemperatur 2.5 Stunden gerührt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch eine Kieselgelsäule und Fließmittel III.
Das Produkt war DC-einheitlich und die Reaktion nach Kedde positiv.
Ausbeute : ca. 6o%
Fp : 138°C
Masse : M^+ bei m/e 521 ($C_{26}H_{35}BrO_7$ - H_2O)
NMR : Signale wie oben beschrieben (s. SBA)
Zwei zusätzliche Tripletts bei δ 2.9 und 3.55 ppm für die α - und ß-CH_2-Gruppierung.
IR : Die Banden verlaufen wie bei α-SBP

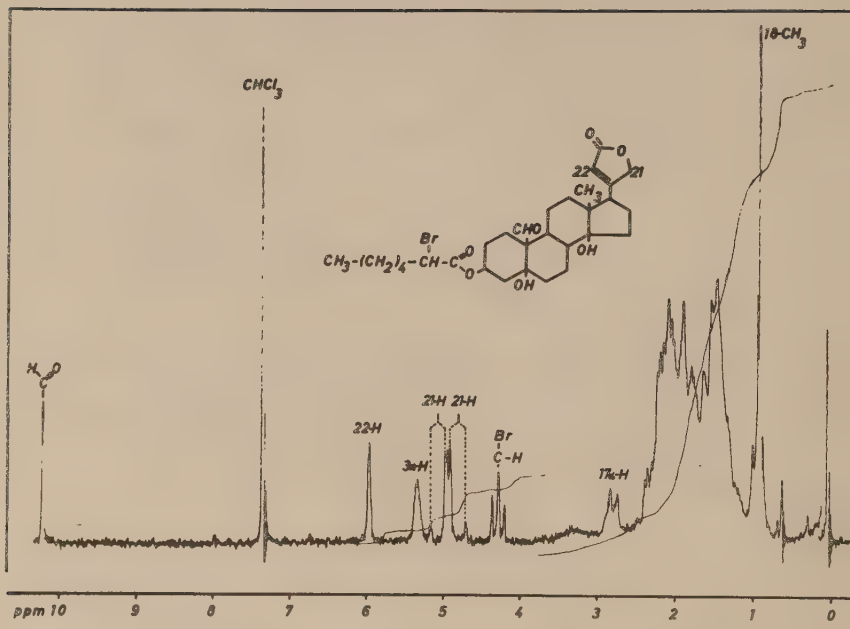


Abb.2: NMR-Spektrum (9o MHz) von Strophanthidin-(3ß-2'-bromcapronat)

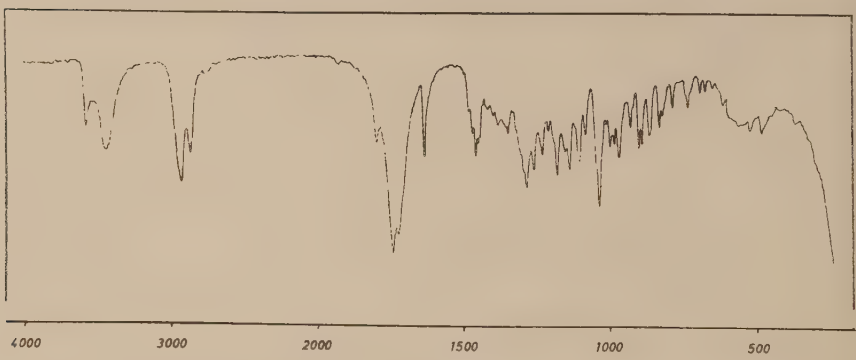


Abb.3: IR-Spektrum (3oo Hz) von Strophanthidin-(3ß-2'-bromcapronat)

2.1.7.5. Strophanthidin-(3ß-2'-bromcapronat) (SBC)

5oo mg (1.24 mmol) Strophanthidin und o.42 ml (5.2 mmol) Pyridin wurden in 3o ml Dioxan gelöst und mit o.74 ml (5.2 mmol) 2-Bromcapronsäurebromid versetzt. Nach 4 Stunden war die Reaktion beendet. Das Rohprodukt wurde durch eine LH_{2o}-Säule und Fließmittel IV gereinigt.
Es war DC-einheitlich und reagierte positiv auf das Reagenz nach Kedde.
Ausbeute : 62%
Fp : 164°C
Masse : M^+ bei m/e 563 ($C_{29}H_{41}BrO_7 - H_2O$)
NMR : Die Signale des Steroidgerüstes erscheinen wie oben beschrieben.
Signal für ungesättigten Laktonring δ 5.35 ppm und δ 4.95 ppm
Signal für Estergruppierung δ 5.35 ppm
Signal für CH_2-Gruppen in Säurekette δ 4.3 ppm
Signal für Methylgruppe am C_{18} δ o.85 ppm
Signal für Aldehydgruppe bei δ 1o.15 ppm (Abb.2)
IR : Mittelstarke, breite Banden bei 328o - 36oo für Wasserstoffbrücken und OH
Mittelstarke Bande bei 294o für tertiäre Methylgruppe mit Sattel bei 287o für Aldehydgruppe
Starke Bande mit Spitze bei 173o für Laktonring und α-Halogenid
Mittelstarke, schmale Bande bei 164o für C=C-Doppelbindung am Lakton
Breite, schwache Bande mit Spitze bei 53o für Bromid (Abb.3)

2.1.7.6. Strophanthidin-(3ß-propionat) (SP)

2oo mg (o.5 mmol) Strophanthidin und 2 ml (2.8 mmol) Pyridin wurden in 3o ml Dioxan gelöst und mit 1.6 ml (1.23 mmol) Propionsäureanhydrid versetzt. Nach 2o Stunden Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde erneut 2 ml Pyridin und 1.6 ml Propionsäureanhydrid hinzugegeben und eine Stunde im Ölbad auf 6o°C erwärmt. Die Reinigung des

Rohproduktes erfolgte durch Säulenchromatographie mittels einer LH_{20}-Säule und Fließmittel III.
Das Produkt war DC-einheitlich und der Nachweis nach Kedde positiv.
Ausbeute : 75.5%
Fp : 210°C
Masse : M^+ bei m/e 442 ($C_{26}H_{26}O_7 - H_2O$)
NMR : Die Signale des Steroidgerüstes verlaufen wie oben beschrieben.
Signal für die CH_3-Gruppe der Propionsäure bei δ 1.28 ppm
Signal für die CH_2-Gruppe der Propionsäure bei δ 1.20 ppm
IR : Mittelstarke, breite Bande bei 3280 - 3600 für Wasserstoffbrücken und OH
Mittelstarke Bande bei 2940 für tertiäre Methylgruppe mit Sattel bei 2870 für Aldehydgruppe
Mittelstarke, schmale Bande bei 1640 für C=C-Doppelbindung am Lakton.

2.1.7.7. Strophanthidin-(3β-capronat) (SC)

200 mg (0.5 mmol) Strophanthidin wurden mit 2 ml (24.8 mmol) Pyridin in 30 ml Dioxan gelöst und mit 1.74 ml (0.8 mmol) Capronsäureanhydrid versetzt. Nach 20 Stunden war die Reaktion beendet. Die Reinigung des Rohproduktes wurde durch eine LH_{20}-Säule und Fließmittel III erreicht.
Das Produkt war DC-einheitlich und zeigte eine positive Reaktion auf den Nachweis nach Kedde.
Ausbeute : 60%
Fp : 201°C
Masse : M^+ bei m/e 484 ($C_{29}H_{42}O_7 - H_2O$)
NMR : Die Signale des Steroidgerüstes erscheinen wie oben beschrieben (s. SBC).
IR : Mittelstarke, breite Bande bei 3280 - 3600 für Wasserstoffbrücken und OH

Mittelstarke Bande bei 2940 für tertiäre Methylgruppe mit Sattel bei 2870 für Aldehydgruppe
Starke Bande mit Spitze bei 1730 für Laktonring
Mittelstarke, schmale Bande bei 1640 für C=C-Doppelbindung am Lakton

2.1.8. Verteilungskoeffizient

Lösungen:

Lipophile Phase : n-Octanol
Hydrophile Phase : 20 mMol Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer (Tris-Puffer), pH 7.4

Die Octanolphase wurde gegen die Trispufferphase im Verhältnis 1 + 10 (v/v) bei Zimmertemperatur 30 min mit einer Frequenz von 240/min geschüttelt (Rüttler, Eigenbau Pharmakologisches Institut, Köln). Anschließend wurden die Phasen in einer Zentrifuge (Fa.Runne, Heidelberg) bei 2000 RPM wieder getrennt. Durch diese gegenseitige Sättigung sollten Verteilungsfehler ausgeschlossen werden, die infolge einer Lösung der Phasen ineinander eine zu hohe Cardenolidkonzentration in den entsprechenden Phasen vortäuschen könnte. Für die Versuchsdurchführung wurden folgende Lösungen benötigt:

Lösung A = n-Octanol mit Tris-Puffer gesättigt
Lösung B = Tris-Puffer mit n-Octanol gesättigt
Lösung C = Strophanthidinderivate 1×10^{-4} M in Lsg. A
Lösung D = Strophanthidinderivate 2×10^{-5} M in Lsg. B

Versuchsdurchführung:

Da die Lipophilie einer Substanz durch die Fähigkeit bestimmt wird, sich zwischen einem hydrophilen und einem hydrophoben Milieu zu verteilen, gilt als relatives Maß dafür der Verteilungskoeffizient P. Dieser Koeffizient wird im System Octanol/Wasser bestimmt, da dies für die Simulierung biologischer Verhältnisse am geeignesten ist (HANSCH und DUNN 1972). Zur Bestimmung von P wurde eine definierte Menge der Lösung A (5 ml) mit variierenden Mengen der Lösung C

3o Minuten im Zentrifugenröhrchen aus Glas auf einem Rüttler (s.o.) geschüttelt. Die Phasen wurden anschließend durch 3o minütiges Zentrifugieren mit 15oo U/min getrennt (Universal II, Fa.Hettich). Die überstehende lipophile Phase wurde abgesaugt und verworfen, die Konzentration der Strophanthidinderivate in der hydrophilen Phase gemessen (s.u.). Die Versuche wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Für Konzentrationsmessungen in der lipophilen Phase wurde eine definierte Menge hydrophiler Phase B (3o ml) mit variierenden Mengen der Lösungen D in 5o ml Weithalsgefäßen aus Glas wie oben beschrieben geschüttelt und zentrifugiert. Die Substanzkonzentration wurde anschließend in der abgetrennten lipophilen Phase gemessen.

Zur Bestimmung der Konzentrationen wurden die Extinktionen der Lösungen mit einem Spektrometer (Aminco DW_2uv/vis) als Differenzmessung zwischen 22o nm und 295 nm bestimmt, da alle Substanzen ein relatives Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 22o nm hatten, das den Laktonring charakterisiert.

2.1.9. Reaktion der Strophanthidinderivate mit Sulfhydrylgruppen (Cystein)

Lösungen:

Lösung A : 1 mMol Cystein in Imidazol/HCl (0.1M) (pH 7.4)
Lösung B : Borax-HCl-Puffer, pH 9.o (Fa. Riedel-De Haen, Hannover)
Lösung C : 1 mmol Strophanthidinderivat in Dimethylformamid (DMF)
Lösung D : 1o mmol 5,5-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) in Phosphatpuffer nach Soerensen (pH 7.o)

Durchführung:
Unter Verwendung der Methode von ELLMANN (1959) wurde geprüft, ob die synthetisierten Strophanthidinderivate die Sulfhydrylgruppe des Cysteins (nucleophile Gruppe) unter HBr-Austritt alkylieren.

Durch äquimolare Umsetzung von DTNB mit aliphatischen Thiolgruppen entsteht ein gelbgefärbtes Anion (ε_m = 412 nm), durch das die Konzentration an nicht alkylierten Sulfhydrylgruppen bestimmt werden kann.

1 ml Lösung A (oder B) reagierten mit 1 ml Lösung C bei Zimmertemperatur. Zu vorher ermittelten Zeiten (2, 5, 1o etc. Min.) wurden o.1 ml dieses Reaktionsgemisches entnommen und in ein Phosphatpuffersystem (pH 8.0) übertragen,das 0,02 ml Lösung D enthielt. Als Kontrollansatz diente ein entsprechender, gleichzeitig gestarteter Ansatz ohne Pharmakon. Die Farbintensität der Proben wurde nach 2o Minuten bei einer Wellenlänge von 412 nm mit einem Spektrometer (Coleman 55, Fa. Perkin-Elmer) bestimmt. Die Sulfhydrylgruppenkonzentration wurde prozentual zum Kontrollwert (Zeitpunkt o) berechnet und gegen die Zeit aufgetragen.

2.2. Prüfung an isolierten Papillarmuskeln von Meerschweinchenherzen

2.2.1. Lösungen

Als Nährlösung diente eine Carbogen-begaste (95% O_2 + 5% CO_2) Tyrodelösung folgender Zusammensetzung:

Na^+ : 149.5 $\pm$ o.2 mmol; K^+ : 5.43 $\pm$ o.o2 mmol; Ca^{2+} : o.91 $\pm$ o.o1 mmol; (jeweils n=15o); Mg^{2+} : 1.o5 mmol; Cl^- : 144.1 mmol; HCO_3^- : 11.9 mmol; $H_2PO_4^-$: o.42 mmol; Glucose : 1o mmol.

Die Na^+- und K^+-Konzentration wurden mittels Flammenphotometrie (Corning EEL 45o, Fa. Evans, England), die Ca^{2+}-Konzentration fluorimetrisch mit einem Corning Calcium Analyzer 94o (Fa. Evans) bestimmt. Der pH-Wert der begasten Lösung lag bei 7.31 $\pm$ o.o5 (n=15o). Die Stammlösungen der Strophanthidinderivate wurden $1x1o^{-3}$ M in 1,2 Propandiol angesetzt. Dieses Lösungsmittel hat im Konzentrationsbereich bis zu 8oo µl/1o ml keinen Einfluß auf die Kontraktionsamplitude isolierter Meerschweinchenpapillarmuskeln (FRICKE und KLAUS 1971).

2.2.2. Versuchsdurchführung

1. Dosiswirkungskurven:

Meerschweinchen beiderlei Geschlechts (19o - 3oo g) wurden durch Genickschlag getötet und aus den Carotiden entblutet. Nach schneller Entnahme des Herzens wurden die Papillarmuskeln aus dem rechten Ventrikel in Tyrodelösung freipräpariert und in ein 1o ml Organbad zwischen Reizelektroden eingehängt. Die Badtemperatur betrug 3o^{o}C; die Vorspannung der Papillarmuskeln 5oo mg; die Muskelpräparate wurden kontinuierlich mit einer Frequenz von 6o/min und einer Impulsdauer von 3 msec (Stimulator T, Fa. Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten) gereizt. Die Kontraktionskraft wurde mittels eines Dehnungsmeßstreifens (Fa. Fleck, Mainz) nach Verstärkung auf einem Direktschreiber (Polygraph Modell 7, Fa. Grass USA) registriert.

Nach einstündiger Äquilibrierungszeit in Tyrodelösung wurden die Strophanthidinderivatlösungen dem Organbad kumulativ in 3o Minuten-Intervallen zugesetzt. In dieser Zeit hatte sich jeweils der Endwert der jeweiligen Wirkung eingestellt. Der Versuch wurde abgebrochen, wenn die Muskelpräparate toxische Zeichen - Abnahme der Kontraktionsamplitude und Kontraktur - aufwiesen. Zur Ermittlung der positiv inotropen Wirkung der Strophanthidinderivate wurde die Änderung der Kontraktionsamplitude (Angabe in Millipond = mp) nach Cardenolidgabe bestimmt und prozentual zum Ausgangswert ausgedrückt.

2.2.3. Anflut- und Auswaschkinetik des inotropen Effektes

Meerschweinchenpapillarmuskel wurde wie oben beschrieben präpariert. Nach einer einstündigen Äquilibrierungszeit wurden aus der Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelte positiv inotrop wirkende, nicht toxische Konzentrationen der Strophanthidinderivate einmalig zugegeben (SA = 1o; SP = 1o; SC = 6; SBA = 2o; α-SBP = 2o; ß-SBP = 6; SBC = 2x1o^{-6}M). Nach einer Stunde (innerhalb dieser

Zeit hatte sich der jeweils maximale Effekt eingestellt), wurden die Bäder der Muskelpräparate dreimal durch frische, carbogendurchperlte, pharmakonfreie Tyrode aus den Vorratsgefäßen erneuert. Die Kontraktionsamplitude wurde solange registriert (in der Regel ca. eine Stunde) bis der Ausgangswert wieder erreicht war. Zur Auswertung wurde die maximale Zunahme der Kontraktionsamplitude gleich 1oo% gesetzt. Die Zunahme und Abnahme des inotropen Effektes wurde in den bestimmten Zeitabständen errechnet. Die angegebenen Zeitkonstanten (t/2 = die Zeit, in der 5o% des positiv inotropen Effektes erreicht bzw. eliminiert war; piE 9o% = die Zeit, in der 9o% des positiv inotropen Effektes eliminiert war) wurden graphisch im halblogarithmischen System nach RESCIGNO und SEGRE (1966) ermittelt.

2.2.4. Anflut- und Auswaschkinetik des toxischen Effektes (Kontraktur)

Meerschweinchenpapillarmuskeln wurden wie oben beschrieben präpariert und eine Stunde in Tyrodelösung äquilibriert. Die Strophanthidinderivate wurden einmalig in einer toxischen Dosis zugegeben, die als vierfache Konzentration der aus den Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelten Maximaldosis festgelegt wurde: SA = 8; SP = 8; SC = 4; SBA = 16; α -SBP = 16; β-SBP = 4; SBC = 1.6 ($x1o^{-5}$M).Als Zeichen der Toxizität galt die Amplitudenabnahme mit gleichzeitiger Kontrakturentwicklung. Die Inkubation mit den Cardenoliden erfolgte bis zum Erreichen einer Kontrakturhöhe von ca. 2oo mp (max. 1 Stunde), anschließend wurde versucht, durch dreimaliges Wechseln der Organbäder mit frischer, carbogendurchperlter, cardenolidfreier Tyrodelösung die Kontraktur rückgängig zu machen. Die Abnahme der Kontraktur wurde in der Regel eine Stunde lang registriert. In einigen Versuchsserien (z.B. SC, SBC) wurde innerhalb dieser Zeit der Ausgangswert (= Kontrollwert) nicht erreicht. In diesem Fall wurden längere Beobachtungszeiten gewählt.

Zur Auswertung wurde das Auftreten einer Kontrakturhöhe von 2oo mp

in Abhängigkeit von der Zeit verglichen. Die maximale Kontraktur wurde gleich 1oo% gesetzt und die Reversibilität des toxischen Effektes in bestimmten Zeitabständen errechnet. Die angegebenen Zeitkonstanten (t/2 = die Zeit, in der 5o% des toxischen Effektes eliminiert war; Tox. 9o% = die Zeit, in der 9o% des toxischen Effektes eliminiert war) wurden im halblogarithmischen System ermittelt.

2.3. Prüfung an der Na^+-K^+-aktivierbare ATPase

2.3.1. Lösungen

Isotone Saccharoselösung: 18o mmol Saccharose, 1oo mmol Imidazol-HCl, 1 mmol Na_2AeDTA, pH 7.4
KCl-Puffer: 5oo mmol KCL, 5 mmol Imidazol-HCl, 1 mmol Na_2AeDTA, pH 7.4
Imidazolpuffer: 1oo mmol Imidazol, 2 mmol Na_2AeDTA, pH 7.4
Phosphatreagenz: Ammoniummolybdat in 2n H_2SO_4

2.3.2. Präparation der mikrosomalen Na^+-K^+-ATPase

Die Präparation der Na^+-K^+-ATPase erfolgte nach FRICKE und KLAUS (1974). Vier bis fünf Meerschweinchen (Tiergewicht 5oo-7oo g) wurden durch Genickschlag getötet und aus den Carotiden entblutet. Die Herzen wurden rasch entnommen, von Vorhöfen, Fett und größeren Gefäßen befreit und in einem Micro Fleischwolf (Fa. Braun, Melsungen) zerkleinert. Durch Zusatz von Saccharosepufferlösung (s. 2.3.1.) wurde ein 15% ige Suspension hergestellt, die 1o Minuten mit einem Zellhomogenisator (Fa. Colora, Lorch) homogenisiert wurde. Anschließend wurde in einer Kühlzentrifuge (Beckmar , Modell J-21B) 15 Minuten bei 11ooo U/m = 12ooo g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehebert und durch ein Millipore-Filter (Typ SCWP; 8 µ Porenweite) gepresst. Das Filtrat wurde auf eine Sepharose 4 B Säule aufgetragen und mit KCl-Pufferlösung (s. 2.3.1.) nach aufsteigender Methode eluiert, Flußrate ca. 4o ml/h. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler (Fa. Serva, Heidelberg) eingefüllt und dreimal gegen Imidazolpuffer (s. 2.3.1.) dialysiert. Sämtliche Arbeitsvorgänge erfolgten bei +4°C.

Das so erhaltene Enzym wurde auf ca. 3oo µg/ml eingestellt.

2.3.3. Messung der ATPase - Aktivitäten

Die Enzymaktivität wurde bei unterschiedlicher Elektrolyt-Zusammensetzung und verschiedenen Konzentrationen der halbsynthetischen Strophanthidinderivate bei 37°C modifiziert nach FRICKE und KLAUS (1974) mit Hilfe des Autoanalyzerprinzips bestimmt (Abb. 4). Durch eine Proportionierungspumpe (13 Kanal Micropumpe Fa. Ismatec, Schweiz) wurde nach 5 minütiger Vorinkubation die ATPase-Reaktion durch Zugabe von ATP gestartet und nach weiteren 1o min. durch Zufügen von Phosphatreagenz (s. 2.3.1.) gestoppt. Die Bestimmung des freigesetzten anorganischen Phosphates erfolgte nach AMADOR und URBAN (1972) bei 34o nm innerhalb des Systems im Durchfluß und wurde auf einem Schreiber (Multipen Recorder, Modell B 161 Auto Z , Fa. Rikadenki, Japan) registriert. Weitere Einzelheiten sind aus der Legende zu Abb. 4 ersichtlich. Es wurden die Aktivitäten der Mg^{2+}-Na^{+}-K^{+}-ATPase (5 mmol $MgCl_2$, 1oo mmol NaCl, 5 mmol KCl), der Mg^{2+}-ATPase (5 mmol $MgCl_2$) und Mg^{2+}-Na^{+}-ATPase (5 mmol $MgCl_2$, 1oo mmol NaCl) bei pH 7.4 (1oo mmol Imidazol/HCl Puffer) ohne (= Kontrolle) und mit variierenden Konzentrationen der halbsynthetischen Strophanthidinderivate bestimmt.

Die Angabe der ATPase-Aktivität erfolgte in µmol P_i/mg Prot. x Std. Der Kontrollwert enthielt die entsprechende Menge Lösungsmittel (Dimethylformamid, DMF).

Die Differenz zwischen Mg^{2+}-Na^{+}-K^{+}-Aktivität (= Gesamtaktivität) und Mg^{2+}-Na^{+}-Aktivität wird als Na^{+}-K^{+}-aktivierbare ATPase bezeichnet.

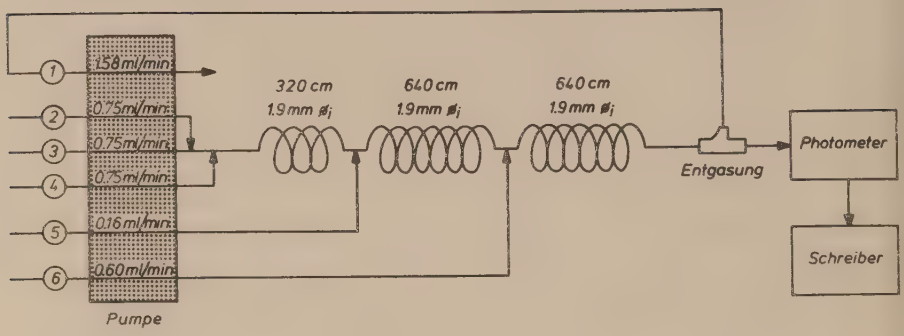


Abb.4

Flußdiagramm der ATPase-Aktivitätsmessung des Autoanalysers:

(1) Absaugen der Luft (De-Sequestrierung der Probe, s. (2))

(2) Luft (Sequestrierung der Probe)

(3) 221.33 mM Imidazol-HCl, 11.o7 mM $MgCl_2$, pH 7.4 bzw. 221.33 mM Imidazol-HCl, 11.o7 mM $MgCl_2$, 221.33 mM NaCl, 11.o7 mM KCl, pH 7.4 (=Standardbedingungen, Endkonzentration im Inkubationsmedium: 5 mM $MgCl_2$, 1oo mM NaCl, 5 mM KCl, 1oo mM Imidazol-HCl) + Cardenolide ($1o^{-1o}$ bis $1o^{-4}$M, Endkonzentration)

(4) mikrosomale ATPase (Proteinkonzentration: ca. 1o-2o ug/ml)

(5) 2o.75 mM ATP-Na_2 (= Standardbedingung, Endkonzentration im Inkubationsmedium: 2 mM)

(6) o.2%ige Ammoniummolybdat in 1n H_2SO_4 (g/v) + 1.2% Tween 8o

2.3.4. Reversibilität der Na^+-K^+-ATPase Hemmung

2.3.4.1. Lösungen

Inkubationsmedium I : 5 mM Mg^{2+}; 1oo mM Na^+ in 1oo mM Imidazol/HCl (pH 7.4), 1o µ/ml 1,2-Propandiol

Inkubationsmedium II : 5 mM Mg^{2+}; 1oo mM Na^+, 5 mM K^+ in 1oo mM Imidazol/HCl (pH 7.4), 1o µ/ml 1,2-Propandiol

Phosphatreagenz nach EIBL und LANDS (1968) :

Lösung A = 6 N H_2SO_4
Lösung B = 2.5% Ammoniumheptamolybdat, o.1% Triton x1oo

Lösung A und B werden mit H_2O bidest im Verhältnis 1+1+9 vor jeder Phosphatbestimmung neu gemischt.

Die Cardenolide wurden $1x1o^{-3}$M bzw. $1x1o^{-4}$M in 1,2-Propandiol (Fa. Merck) gelöst.

2.3.4.2. Versuchsdurchführung

Die Stabilität des Enzym-Cardenolid-Komplexes wurde modifiziert nach PETERS et al. (1974) bestimmt (Abb.5). Die Versuchsanordnung bestand aus 3 Kontrollansätzen und 3 Pharmakonansätzen.

1. ATP-Leerwert (Inkubationsmedium II)
2. Mg^{2+}-Na^+-Aktivität (Inkubationsmedium I + 12o µg/ml Enzym)
3. Gesamtaktivität (Inkubationsmedium II + 12o µg/ml Enzym)

Die Pharmakonansätze 4, 5 und 6 enthielten identische Ionenkonzentrationen (Inkubationsmedium II - 1o µl/ml 1,2-Propandiol) und Enzymkonzentrationen (12o µg/ml) bei verschiedener Cardenolidkonzentration. Diese Konzentration in den Ansätzen 4 und 5 betrug $1x1o^{-5}$M, in Ansatz 6 war nur 1/1o der Cardenolidkonzentration der Ansätze 4 bzw. 5, also $1x1o^{-6}$M enthalten. Nach 1o Minuten Vorinkubation wurde die Reaktion in allen Ansätzen mit o.1 ml ATP-Lösung gestartet; die ATP-Endkonzentration war 2 mM. Nach 3o minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Eintragen in Reagenz nach EIBL und LANDS (1969)

(s. 2.3.4.1.) zur Bestimmung des gebildeten anorganischen Phosphates abgebrochen (Verdünnung 1:2o). Gleichzeitig wurden o.1 ml der Proben (= 1/1o des Volumens) aus obigen Ansätzen in einen neuen, 1o Minuten vorinkubierten Versuchsansatz überführt. Dieser Ansatz hatte dieselben Inkubationsmedien, aber nur 1/1o der Enzymkonzentration (12 µg/ml) des ersten Ansatzes. Der zweite Pharmakonansatz 2 enthielt außerdem nur 1/1o der Cardenolidkonzentration ($1o^{-6}$M). Die Inkubation des zweiten Ansatzes wurde nach weiteren 3o min beendet. Die Inkubation erfolgte bei 37^{o}C.

Der Gehalt an anorganischem Phosphat in beiden Versuchsreihen wurde jeweils 2o Minuten nach Eintragen in das Phosphatreagenz mit einem Spektrometer (Coleman 55, Fa. Perkin-Elmer) bei einer Wellenlänge von 66o nm bestimmt.

Aus den Phosphatkonzentrationen im ersten bzw. der Differenz der Phosphatkonzentrationen nach 3o und 6o Minuten im zweiten Schritt ließ sich nach Abzug des ATP-Leerwertes die Aktivität der ATPase in jeder Probe errechnen. Der Vorteil der vorliegenden gegenüber der von PETERS et al. (1974) entwickelten Methode lag darin, daß aus der Differenz der Mg^{2+}-Na^{+}-Aktivität und den Gesamtaktivitäten des Kontrollwertes sowie der Pharmakonansätze die Aktivität der Na^{+}-K^{+}-aktivierbaren ATPase bestimmt und damit Aussagen über ihre prozentuale Hemmung bei den jeweiligen Cardenolidkonzentrationen im 1. und 2. Schritt gemacht werden konnte. Die Enzymhemmung der Pharmakonansätze im 2. Schritt diente zur Berechnung der Reversibilität. Probe 4 beschreibt die ATPase-Hemmung bei höherer, Probe 6 bei niedriger Cardenolidkonzentration. Je nach Stabilität des Enzym-Cardenolid-Komplexes näherte sich der Wert der Probe 5 bei zunehmender Irreversibilität dem Wert 4, bei leichter Reversibilität dem Wert 6.

2.4. Proteinbestimmung

Alle Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von LOWRY et al. (1951) durchgeführt.

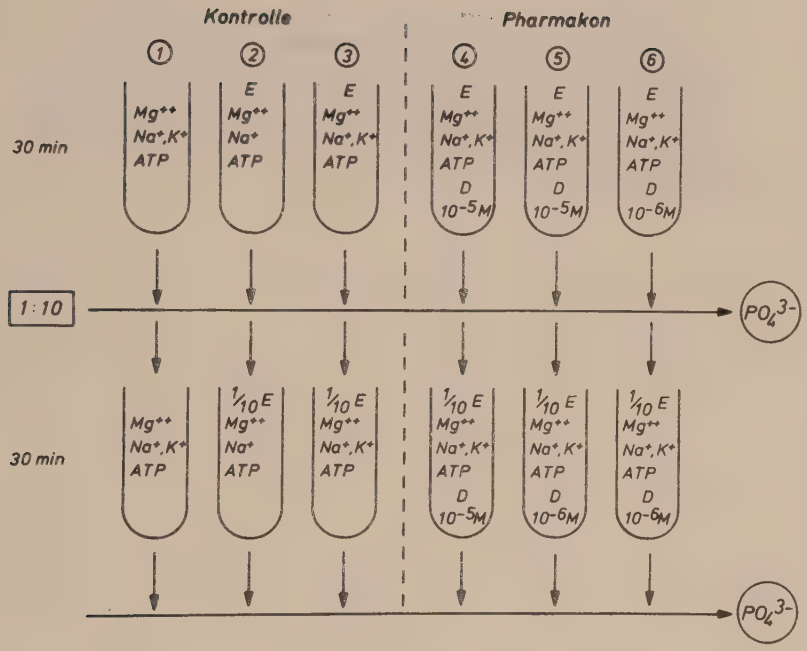


Abb.5

Schematische Darstellung der Reversibilitätsmessung der ATPase-Hemmung.
Ansatz 1, 2, 3 = Kontrollwerte ohne Pharmakon
Ansatz 4, 5, 6 enthalten zwei verschiedene Pharmakonkonzentrationen. Die Reaktion der 6 Ansätze wird gleichzeitig gestartet.
E = Enzym, ATP = Adenosintriphosphat, D = Pharmakon
PO_4^{3-} = anorganisches Phosphat
(Details siehe Text)

2.5. Statistik

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte wurden nach SNEDECOR und COCHRAN (1967) errechnet. Die Werte für den 1o% igen Effekt (ED 1o) und die halbmaximalen Effekte (ED 5o und ID 5o) wurden mit Hilfe der Logit-Transformation nach HAFNER et al. (1977) bestimmt. Die Signifikanzprüfungen erfolgten nach dem Student t-Test.

3. ERGEBNISSE

3.1. Verteilungskoeffizient

In Tab.1 sind die Verteilungskoeffizienten der synthetisierten Strophanthidinderivate im System Octanol/Wasser dargestellt. Vergleicht man die Derivate miteinander, deren Seitenkette nicht bromiert ist, hatte das SA den niedrigsten Verteilungskoeffizienten (P = 9.5) und SC den höchsten (P = 21.1). SP nahm eine Mittelstellung ein (P = 14.3).

Die bromierten Strophanthidinabkömmlinge wiesen dieselbe Tendenz auf: SBA (P = 13.2), α-SBP (P = 15.4), β-SBP (P = 18.o), SBC (P = 24.2); zeigten jedoch einen jeweils höheren Verteilungskoeffizienten als die entsprechenden nicht-bromierten Muttersubstanzen.

3.2. Umsetzung mit Sulfhydrylgruppen (Cystein)

Da durch "affinity labeling" nucleophile Gruppen des Enzyms kovalent gebunden werden sollten, wurden die synthetisierten Strophanthidinderivate auf ihre Fähigkeit zur Umsetzung mit der Sulfhydrylgruppe des Cysteins geprüft (Abb.6). Wie Abb.7 zeigt, unterschieden sich die Cardenolide, deren Seitenkette nicht bromiert ist, nach 9o Minuten im physiologischen pH-Bereich von 7.4 nicht wesentlich von dem Kontrollwert. Wird die Seitenkette am C_3 des Strophanthidins bromsubstituiert, so ergeben sich folgende Unterschiede; SBA alkylierte am stärksten, denn es setzte innerhalb von 9o Minuten 8o% der SH-Gruppen um. α-SBP und β-SBP hatten nach dieser Zeit mit 12 bzw. 14% der verfügbaren SH-Gruppen reagiert, während SBC nur 5% der SH-Gruppen kovalent binden konnte.

Die alkylierenden Eigenschaften der bromsubstituierten Strophanthidinderivate verbesserten sich mit steigendem pH-Wert der Reaktionslösung wesentlich.

Substanz		Verteilungskoeffizient P
Strophanthidin-3β-acetat	(SA)	9.5 ± 0.6
Strophanthidin-3β-propionat	(SP)	14.3 ± 0.3
Strophanthidin-3β-capronat	(SC)	21.1 ± 1.1
Strophanthidin-(3β-2'-bromacetat)	(SBA)	13.2 ± 1.6
Strophanthidin-(3β-2'-brompropionat)	(α-SBP)	15.4 ± 0.7
Strophanthidin-(3β-3'-brompropionat)	(β-SBP)	18.0 ± 2.3
Strophanthidin-(3β-2'-bromcapronat)	(SBC)	24.2 ± 0.7

Tabelle 1:

Octanol/Wasser Verteilungskoeffizient (P) der Strophanthidinderivate im System Octanol/Trispuffer.
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus jeweils 5 Bestimmungen.

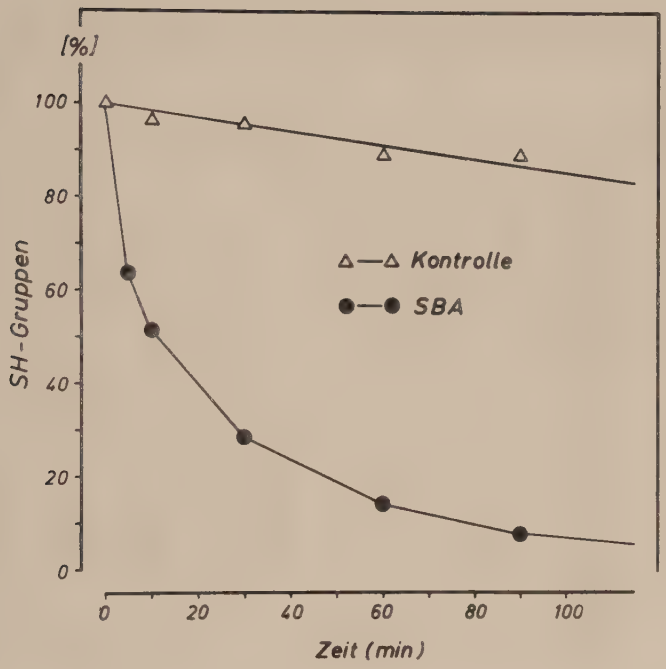


Abb.6

Umsetzung (Ordinate in %) von Strophanthidin-(3ß-2'-bromacetat) mit Cystein bei Raumtemperatur und pH 7.4 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Abszisse in Minuten).
Der Kontrollansatz enthält kein Pharmakon.

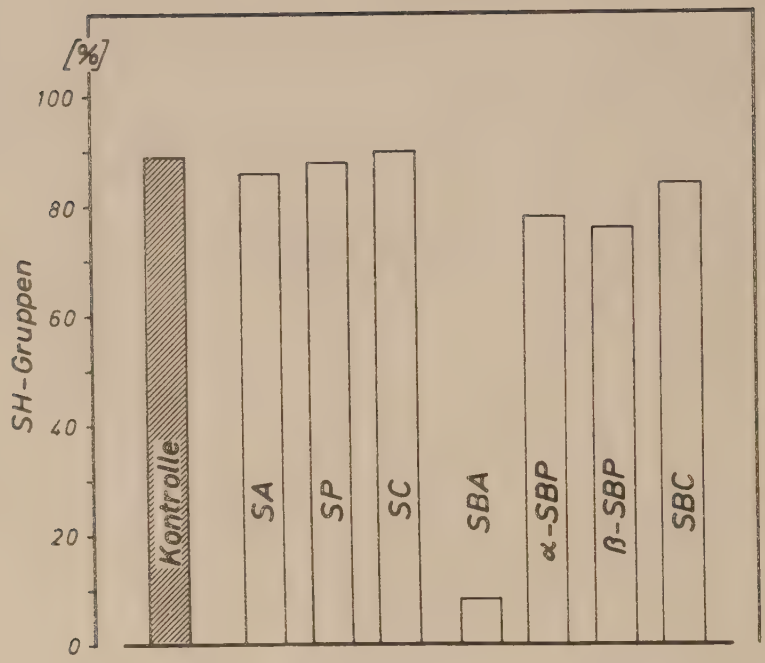


Abb.7

Umsetzung der Sulfhydrylgruppe des Cysteins (Ordinate in %) mit den angegebenen Strophanthidinderivaten nach 9o minütiger Inkubationsdauer (Raumtemperatur, pH 7.4)

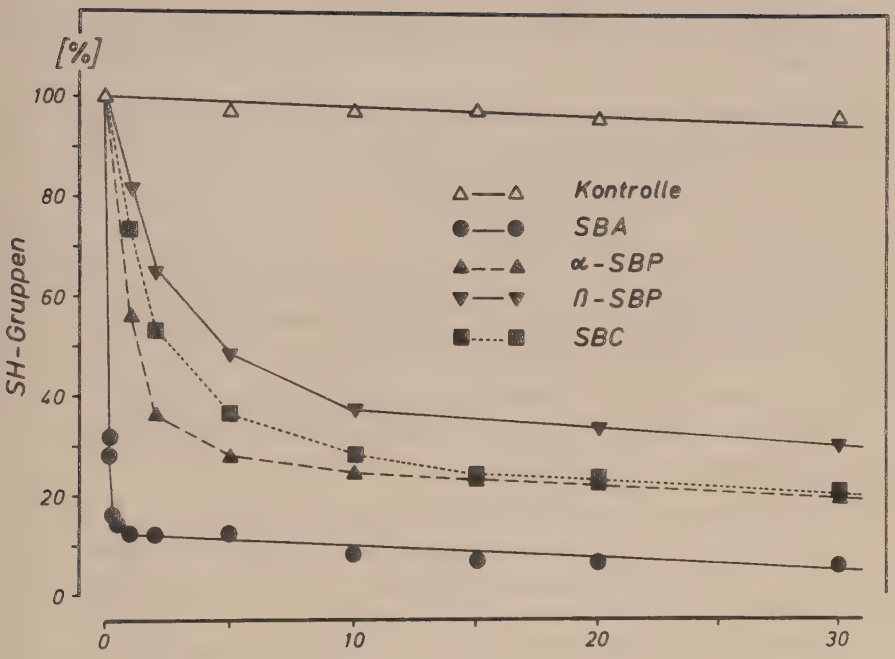


Abb.8

Zeitverlauf (Abszisse in Min.) der Umsetzung (Ordinate in %) von Sulfhydrylgruppen des Cysteins mit den bromsubstituierten Strophanthidinderivaten SBA, α-SBP, ß-SBP und SBC bei pH 9.0 (Raumtemperatur)
Der Kontrollansatz enthält kein Pharmakon.

Bei pH 9.o hatte SBA nach 1o Minuten schon mit 89% der SH-Gruppen reagiert, α -SBP und SBC brauchten für eine ca. 8o%ige Alkylierung 6o Minuten. ß-SBP setzte nach 6o Minuten 75% der SH-Gruppen um (Abb.8).

3.3. Wirkung der halbsynthetischen Strophanthidinderivate am Meerschweinchenpapillarmuskel

3.3.1. Dosis-Wirkungsbeziehung

In Abb.9 sind die Dosis-Wirkungs-Kurven der Strophanthidinderivate mit nicht bromierter Seitenkette dargestellt, Abb.1o zeigt die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Cardenolide, deren Seitenkette am C_3 des Steroidgerüstes bromsubstituiert ist .

Die entsprechenden Zahlenwerte werden in den Tabellen 2-8 aufgeführt. Alle Substanzen steigern die Kontraktionskraft des isolierten Papillarmuskels konzentrationsabhängig.

Die Wirkungsbreite, die den Konzentrationsbereich von der Entwicklung eines 1o%igen positiv inotropen Effektes (ED 10) bis zum Abbruch der Dosis-Wirkungskurve (ED max) infolge toxischer Effekte umfaßt, nahm in der Gruppe der nicht bromsubstituierten Derivate mit zunehmender Kettenlänge ab (Abb.11), während der maximale inotrope Effekt (piE max) bei allen drei Substanzen annähernd gleich war. SA hatte einen positiv inotropen Wirkungsbereich von $1.6x1o^{-7}$ bis $2x1o^{-5}$M und einen piE max von 131.9 ± 22.8% (n=8), die ED 5o, d.h. die Konzentration, bei der die halbmaximale Zunahme der Kontraktionsamplitude erreicht wird, wurde mit $5.2x1o^{-6}$M ermittelt. SP verhielt sich sehr ähnlich mit einem Wirkungsbereich von $2.1x1o^{-7}$ bis $2x1o^{-5}$M und einem piE max von 143.3 ± 29% (n=7), die ED 5o wurde mit $6.6x1o^{-6}$M bestimmt. Der Wirkbereich von SC lag zwischen $5.5x10^{-7}$ und $1x10^{-5}$M, der piE max wurde mit 1o6.6 ± 17.3% (n=8) ermittelt, die ED 5o betrug $3.1x1o^{-6}$M.

Die bromsubstituierten Strophanthidinderivate unterschieden sich kaum in der Wirkungsbreite. Auffällig war, daß der Wirkbereich von SBC gegenüber den übrigen Derivaten in den Bereich niedrigerer Konzentrationen verschoben war.

SBA hatte einen positiv inotropen Bereich von $1.2x10^{-6}$ bis $4x10^{-5}$M, einen piE max von 151.1 $\pm$ 12.3% (n=8) und eine ED 50 von $6.3x10^{-6}$M. Für α-SBP ergab sich ein Wirkungsbereich von $2.1x10^{-6}$ bis $4x10^{-5}$M, einen piE max von 199.9 $\pm$ 38.1% (n=8) und eine ED 50 von $1.2x10^{-5}$M. ß-SBP entwickelte seine positiv inotrope Wirkung zwischen $5.5x10^{-7}$ und $1x10^{-5}$M, hatte einen piE max von 190.5 $\pm$ 38.6% (n=7), die ED 50 betrug $2.7x10^{-6}$M. Der Wirkungsbereich von SBC erstreckte sich von $1x10^{-7}$ bis $4x10^{-6}$M, der piE max wurde mit 119.2 $\pm$ 29.2% (n=8), die ED 50 bei $8.2x10^{-7}$M ermittelt.

Eine Übersicht über die ED 50 Werte zeigt Tab.9.

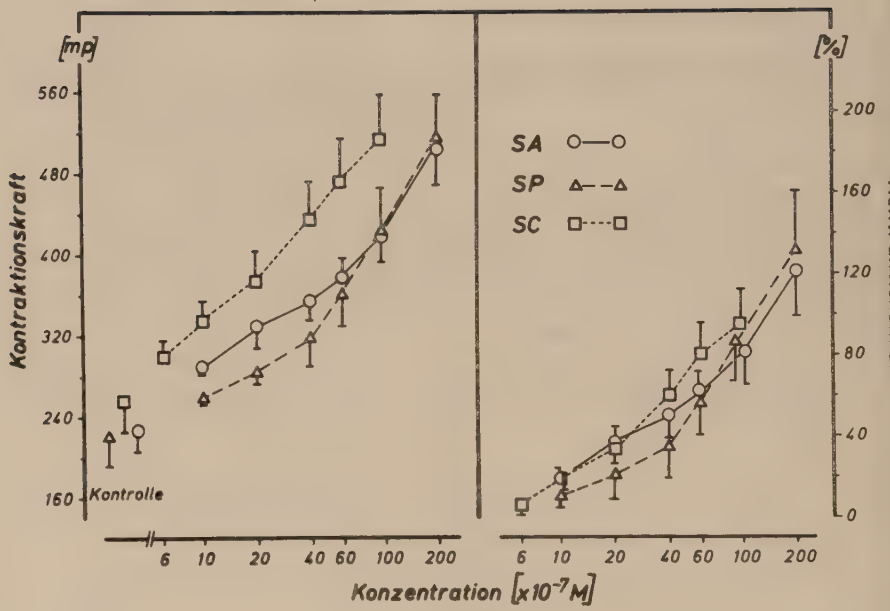


Abb.9

Zunahme der Kontraktionskraft von Meerschweinchenpapillarmuskeln (Ordinate, Angabe in mp bzw. %) bei kumulativer Zugabe inotrop wirkender Konzentrationen der Strophanthidinderivate SA, SP und SC (Abszisse, Angabe in M).
Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen der Mittelwerte von 7-8 Versuchen.

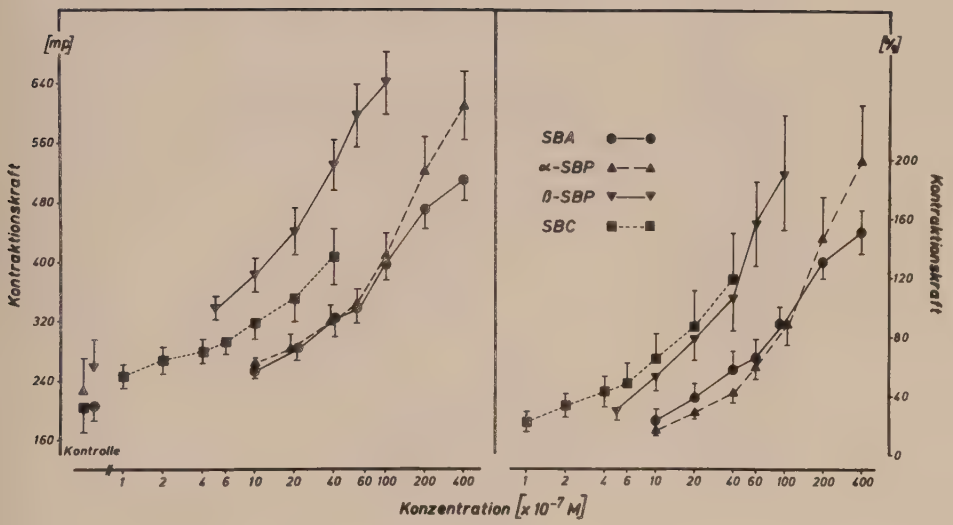


Abb.1o

Zunahme der Kontraktionskraft von Meerschweinchenpapillarmuskeln (Ordinate, Angabe in mp bzw. %) bei kumulativer Zugabe inotrop wirkender Konzentrationen der Strophanthidinderivate SBA, α -SBP, β-SBP und SBC (Abszisse, Angabe in M).
Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen der Mittelwerte von 7-9 Versuchen.

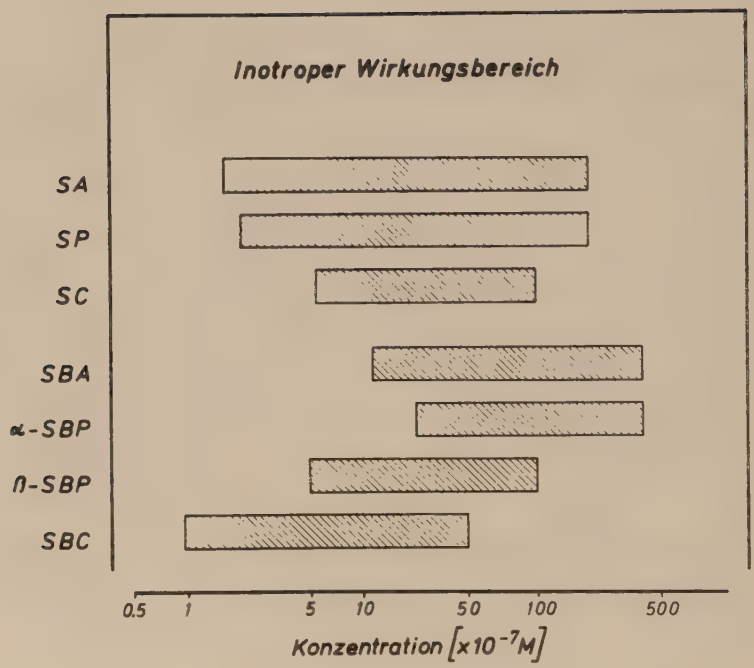


Abb.11

Aus der Dosis-Wirkungskurve ermittelter positiv inotroper Wirkungsbereich (Abszisse: ED 1o - ED max., Angabe in M)der angegebenen Strophanthidinderivate.

Strophanthidin-(3ß-acetat)

KONZENTRATION ($x10^{-7}M$)	MP	%
1o	62.2 ± 7.6	28.4 ± 3.5
	N = 8	
2o	1o2.2 ± 19.5	47.3 ± 9.5
	N = 8	
4o	128.1 ± 2o.6	6o.5 ± 11.6
	N = 8	
6o	15o.6 ± 2o.1	71.1 ± 12.9
	N = 8	
1oo	193.8 ± 27.1	9o.1 ± 15.7
	N = 8	
2oo	28o.3 ± 36.5	131.9 ± 22.8
	N = 8	

Tabelle 2:

Zunahme der Kontraktionsamplitude von Meerschweinchenpapillarmuskeln in Millipond (mp) bzw. Prozent (%) nach kumulativer Zugabe steigender Konzentrationen von Strophanthidin-3ß-acetat (SA).
Die Kontraktionsamplitude vor Zugabe der Substanz (Kontrolle) betrug 227.5 ± 22.3 mp (n=8).
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus der angegebenen Anzahl von Versuchen.

Strophanthidin-(3ß-propionat)

KONZENTRATION ($x10^{-7}$M)	MP	%
1o	37.5 ± 8.8	21.2 ± 6.3
	N = 5	
2o	63.8 ± 22.6	31.8 ± 12.o
	N = 6	
4o	95.o ± 28.5	42.3 ± 15.5
	N = 6	
6o	138.6 ± 31.o	68.5 ± 17.3
	N = 7	
1oo	2o2.8 ± 4o.5	93.3 ± 22.2
	N = 7	
2oo	295.7 ± 52.o	143.3 ± 29.o
	N = 7	

Tabelle 3:

Zunahme der Kontraktionsamplitude von Meerschweinchenpapillarmuskeln in Millipond (mp) bzw. Prozent (%) nach kumulativer Zugabe steigender Konzentrationen von Strophanthidin-3ß-propionat (SP).
Die Kontraktionsamplitude vor Zugabe der Substanz (Kontrolle) betrug 222.1 ± 3o.4 mp (n=7).
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus der angegebenen Anzahl von Versuchen.

Strophanthidin-(3ß-capronat)

KONZENTRATION ($x10^{-7}$ M)	MP	%
6	45.0 ± 18.3	16.3 ± 5.2
	N = 5	
10	79.7 ± 20.7	29.9 ± 5.6
	N = 8	
20	119.4 ± 27.8	44.7 ± 8.7
	N = 8	
40	181.3 ± 36.8	71.8 ± 12.8
	N = 8	
60	216.6 ± 41.8	91.3 ± 15.3
	N = 8	
100	260.0 ± 44.4	106.0 ± 17.3
	N = 8	

Tabelle 4:

Zunahme der Kontraktionsamplitude von Meerschweinchenpapillarmuskeln in Millipond (mp) bzw. Prozent (%) nach kumulativer Zugabe steigender Konzentrationen von Strophanthidin-3ß-capronat (SC).
Die Kontraktionsamplitude vor Zugabe der Substanz (Kontrolle) betrug 254.7 ± 30.9 mp (n=8).
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus der angegebenen Anzahl von Versuchen.

Strophanthidin-(3ß-2'-bromacetat)

KONZENTRATION ($x10^{-7}$ M)	MP	%
10	47.8 ± 10.7	23.6 ± 5.3
	N = 8	
20	77.2 ± 15.3	38.7 ± 7.5
	N = 8	
40	115.9 ± 21.4	57.7 ± 10.2
	N = 8	
60	133.1 ± 21.5	65.7 ± 10.2
	N = 8	
100	181.9 ± 20.6	89.3 ± 9.3
	N = 8	
200	265.6 ± 24.4	130.5 ± 9.9
	N = 8	
400	305.3 ± 23.7	151.1 ± 12.3
	N = 8	

Tabelle 5:

Zunahme der Kontraktionsamplitude von Meerschweinchenpapillarmuskeln in Millipond (mp) bzw. Prozent (%) nach kumulativer Zugabe steigender Konzentrationen von Strophanthidin-(3ß-2'-bromacetat) (SBA).
Die Kontraktionsamplitude vor Zugabe der Substanz (Kontrolle) betrug 206.3 ± 17.3 mp (n=8).
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus der angegebenen Anzahl von Versuchen.

Strophanthidin-(3β-2'-brompropionat)

KONZENTRATION ($x10^{-7}$M)	MP	%
1o	35.3 ± 8.2	16.4 ± 3.6
	N = 9	
2o	55.3 ± 15.9	28.4 ± 4.5
	N = 9	
4o	92.5 ± 18.o	42.2 ± 7.2
	N = 9	
6o	126.o ± 18.1	59.7 ± 8.5
	N = 9	
1oo	18o.9 ± 28.5	87.3 ± 13.8
	N = 9	
2oo	294.7 ± 42.4	147.2 ± 27.1
	N = 9	
4oo	382.5 ± 46.8	199.9 ± 38.1
	N = 9	

Tabelle 6:

Zunahme der Kontraktionsamplitude von Meerschweinchenpapillarmuskeln in Millipond (mp) bzw. Prozent (%) nach kumulativer Zugabe steigender Konzentrationen von Strophanthidin-(3β-2'-brompropionat) (α-SBP).
Die Kontraktionsamplitude vor Zugabe der Substanz (Kontrolle) betrug 228.8 ± 4o.o mp (n=9).
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus der angegebenen Anzahl von Versuchen.

Strophanthidin-(3β-3'-brompropionat)

KONZENTRATION ($x10^{-7}$ M)	MP	%
6	77.1 ± 16.3	30.7 ± 7.3
	N = 6	
10	122.9 ± 21.9	53.0 ± 10.8
	N = 7	
20	182.5 ± 29.2	78.1 ± 14.3
	N = 7	
40	272.9 ± 33.3	106.4 ± 22.3
	N = 7	
60	339.2 ± 44.2	156.2 ± 28.5
	N = 7	
100	403.3 ± 42.7	190.5 ± 38.6
	N = 7	

Tabelle 7:

Zunahme der Kontraktionsamplitude von Meerschweinchenpapillarmuskeln in Millipond (mp) bzw. Prozent (%) nach kumulativer Zugabe steigender Konzentrationen von Strophanthidin-(3β-3'-brompropionat) (β-SBP).
Die Kontraktionsamplitude vor Zugabe der Substanz (Kontrolle) betrug 259.3 ± 38.9 mp)n=7).
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus der angegebenen Anzahl von Versuchen.

Strophanthidin-(3β-2'-bromcapronat)

KONZENTRATION ($x10^{-7}M$)	MP	%
1	42.2 ± 13.1 N = 8	22.6 ± 7.0
2	64.1 ± 14.4 N = 8	33.0 ± 8.0
4	75.9 ± 16.0 N = 8	42.6 ± 10.8
6	89.9 ± 17.8 N = 8	48.7 ± 12.0
10	114.7 ± 20.5 N = 8	65.8 ± 15.4
20	147.8 ± 25.1 N = 8	87.7 ± 22.8
40	204.7 ± 33.7 N = 8	119.2 ± 29.2

Tabelle 8:

Zunahme der Kontraktionsamplitude von Meerschweinchenpapillarmuskeln in Millipond (mp) bzw. Prozent (%) nach kumulativer Zugabe steigender Konzentrationen von Strophanthidin-(3β-2'-bromcapronat) (SBC).
Die Kontraktionsamplitude vor Zugabe der Substanz (Kontrolle) betrug 204.7 ± 29.9 mp (n=8).
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus der angegebenen Anzahl von Versuchen.

SUBSTANZ	ED_{50} ($x10^{-6}M$)	N
SA	5.2 ± 0.4	8
SP	6.6 ± 0.9	7
SC	3.1 ± 0.6	8
SBA	6.3 ± 1.0	8
α-SBP	12.1 ± 2.0	9
β-SBP	2.7 ± 0.6	7
SBC	0.8 ± 0.1	8

Tabelle 9:

Konzentrationen für die halbmaximale positiv inotrope Wirkung (ED 50) der aufgeführten Strophanthidinderivate am isolierten Meerschweinchenpapillarmuskel.
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus der jeweils aufgeführten Anzahl von Versuchen (n).

3.3.2. Anflut- und Auswaschkinetik des positiv inotropen Effektes

In Abb.12 und 13 ist die Invasion und Evasion exemplarisch für die Substanzen α-SBP und SBC dargestellt, die durch positiv inotrop wirkende Konzentrationen (s. 2.2.3.) ermittelt wurden.

In Tab. 10 sind die aus den entsprechenden Zeitverläufen ermittelten Halbwertszeiten (t/2) sämtlicher untersuchter Strophanthidinderivate wiedergegeben. Vergleicht man die nicht-bromsubstituierten Derivate miteinander, so zeigte SA (t/2 = 5.9 min) den langsamsten Anfluteffekt. SP nahm eine Mittelstellung ein (t/2 5.4 min) und SC (t/2 = 4.1 min) wies den schnellsten Anfluteffekt auf.

Wird in α-Stellung der Seitenkette Brom substituiert, so verlangsamte sich das Anfluten im Vergleich zu den nicht substituierten Analoga:
SBA (t/2 = 1o.4 min); α-SBP (t/2 = 8.o min); SBC (t/2 = 6.6 min)

Innerhalb der Gruppe der bromsubstituierten Derivate hatten die längerkettigen ebenfalls die schnellere Anflutgeschwindigkeit. Die Bromsubstitution in ß-Stellung der Seitenkette (ß-SBP) hatte eine kürzere Halbwertszeit zur Folge (t/2 = 4.5 min).

Die Halbwertszeiten für die Elimination des positiv inotropen Effektes ergaben die umgekehrte Reihenfolge. Innerhalb dieser Gruppe, deren Seitenkette nicht bromsubstituiert ist, hatte SA (t/2 = ca. 4 min) die kürzeste und SC (t/2 = ca. 6 min) die längste Abklingrate. SP (t/2 = 5.2 min) nahm eine Mittelstellung ein.

Die α-Bromsubstitution der Seitenkette bewirkte einen langsameren Wirkungsverlust.

SBA und α-SBP zeigten dabei einen deutlich biphasischen Kurvenverlauf. Es konnten eine schnelle Komponente, die beim SBA (t/2 = 1.5 min) etwa 3o% des positiv inotropen Effektes ausmachte und eine langsame Komponente (t/2 = 26.7 min), die etwa 7o% betrug,

unterschieden werden. Dagegen wurden 55% des pharmakologischen Effektes von α-SBP schnell (t/2 = 2.3 min) ausgewaschen, während die restlichen 45% mit einer Halbwertszeit von 28.3 min eliminiert wurden. SBC zeigte einen monophasischen Kurvenverlauf (t/2 = 12.6 min). ß-SBP (t/2 = 4.5 min) nahm eine mittlere Stellung ein. Vergleicht man die Zeiten, die nötig waren, um 9o% des positiv inotropen Effektes auszuwaschen (Abb.14), so nimmt die Wirkungsdauer am Papillarmuskel bei den nicht bromsubstituierten Derivaten von SA (13.4 min) zum SC (19.2 min) zu. SP hatte eine mittlere Auswaschzeit von 17.5 min.

Durch α-Bromsubstitution kam es zu längeren Auswaschzeiten. Innerhalb dieser Gruppe hatte SBA (ca. 76 min) die längste, SBC (43.5 min) die kürzeste Wirkungsdauer. α-SBP nahm mit 6o.4 min eine mittlere Stellung ein. Das ß-bromsubstituierte SBP (15.8 min) hatte eine ähnliche Wirkungsdauer wie die Gruppe der Strophanthidinderivate, deren Seitenkette nicht bromiert ist.

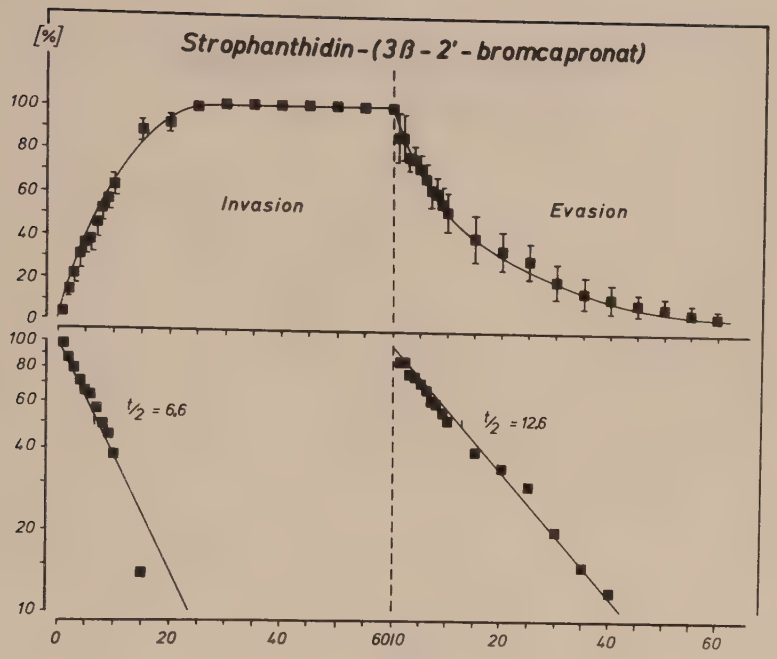


Abb.12

Links:
Prozentuale Zunahme (Invasion) des positiv inotropen Effektes von SBC (Ordinate) nach Zugabe von $2x10^{-6}$M in Abhängigkeit von der Zeit (Abszisse, Angabe in Min.).
Rechts:
Prozentuale Abnahme (Evasion) des positiv inotropen Effektes von SBC in pharmakonfreier Tyrodelösung.
Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen der Mittelwerte von 7-8 Versuchen.

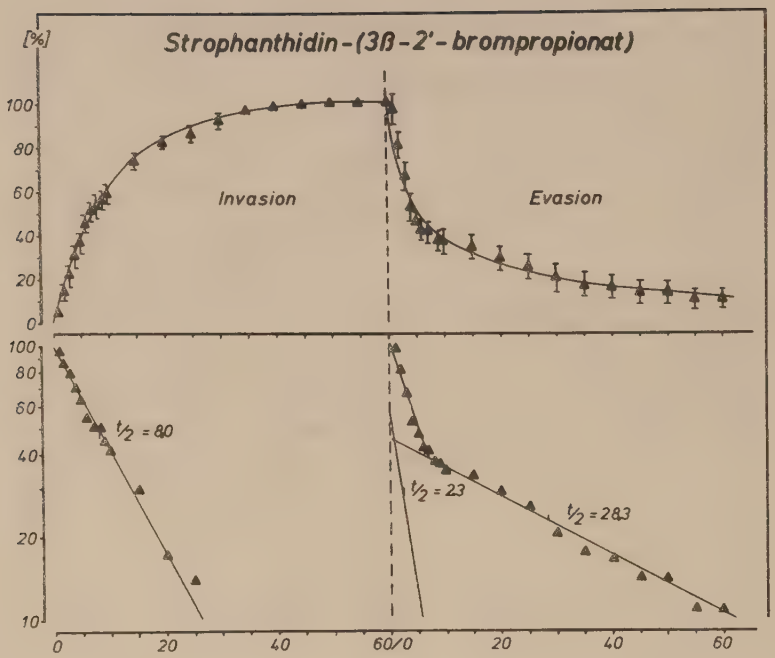


Abb.13

Links:
Prozentuale Zunahme (Invasion) des positiv inotropen Effektes von α -SBP (Ordinate) nach Zugabe von 2×10^{-5}M in Abhängigkeit von der Zeit (Abszisse in Min.).
Rechts:
Prozentuale Abnahme (Evasion) des positiv inotropen Effektes von α -SBP in pharmakonfreier Tyrodelösung.
Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen der Mittelwerte aus 7-8 Versuchen.

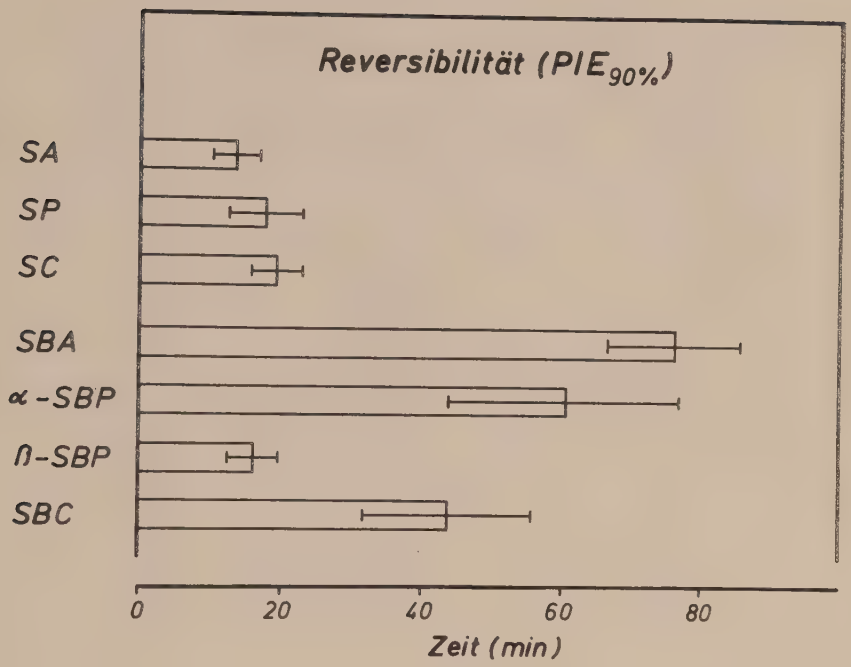


Abb.14

Abklinggeschwindigkeit des positiv inotropen Effektes (piE) der angegebenen Strophanthidinderivate.
Dauer (Abszisse, Angabe in Min.) bis zur Elimination von 9o% des piE.
Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen der Mittelwerte von je 7-8 Versuchen.

Substanz	Konz. (M)	A: Invasion t/2 (min)	N	B: Evasion t/2 (min) (1)	t/2 (min) (2)	N
SA	$1x10^{-5}$	5,9 ± 0,7	7	4,0 ± 0,9		7
SP	$1x10^{-5}$	5,4 ± 0,8	8	5,2 ± 1,5		6
SC	$1x10^{-6}$	4,1 ± 0,3	7	6,0 ± 1,0		8
SBA	$2x10^{-5}$	10,4 ± 1,5	7	1,5 ± 0,3	26,7 ± 4,4	8
α-SBP	$2x10^{-5}$	7,8 ± 0,7	7	2,3 ± 0,3	28,3 ± 3,5	8
β-SBP	$8x10^{-6}$	4,5 ± 0,7	8	4,5 ± 0,9		7
SBC	$2x10^{-6}$	6,8 ± 0,9	7	12,6 ± 3,5		8

Tabelle 1o:

Entwicklung und Elimination des positiv inotropen Effektes der geprüften Cardenolide.
A: Entwicklung des positiv inotropen Effektes nach Zugabe der angegebenen Konzentration der jeweiligen Substanz (Invasion).
B: Abnahme des jeweiligen positiv inotropen Effektes in cardenolidfreier Tyrodelösung (Evasion).
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus der aufgeführten Anzahl von Versuchen.

3.3.3. Anflut- und Auswaschkinetik des toxischen Effektes

Die Zeiten, innerhalb derer die Strophanthidinderivate eine definierte Kontrakturhöhe (2oo mp) erreichten, die ca. 5o% der maximal erreichbaren Kontrakturhöhe entsprach, sind in Tab.11 aufgeführt. Dabei können einmal die Anflutzeiten bewertet werden, die sich nach Zugabe des Pharmakons ergeben (I). Diese setzen sich jedoch aus zwei verschiedenen Prozessen zusammen: 1) der initialen positiv inotropen Wirkung und 2) der intermittierend beginnenden toxischen Wirkung (Kontraktur). Um die reine toxische Wirkung zu analysieren, wurden daher zum anderen die Zeiten nach Kontrakturbeginn ermittelt (II).

Die Cardenolide,deren Seitenkette nicht bromsubstituiert ist hatten nahezu identische Anflutgeschwindigkeiten:
SA = 24 min (16.8 min nach Kontrakturbeginn), SP = 28 min (18.o min), SC = 22 min (16.o min).

Mit Bromsubstitution der Seitenkette verlängerte sich die Zeit bis zum Erreichen des geforderten toxischen Effektes:
SBA = 4o min (27.o min), β-SBP = 37.o min (23.8min),
SBC = 39 min (19.4 min).

Auch in dieser Gruppe konnte eine deutliche Übereinstimmung der Anflutraten festgestellt werden. Abweichend davon lag die Anflutgeschwindigkeit von α-SBP (22 min bzw. 14.2 min) im Bereich der nicht-bromierten Cardenolide.

Die für die Evasion ermittelten Werte sind ebenfalls in Tab.11 dargestellt.

SP hat eine sehr kurze Abklingrate mit einer Halbwertszeit von 4.7 min, SC die längste mit einer Halbwertszeit von 63.4 min. SA nahm eine Mittelstellung ein, die Hälfte der Kontraktur wurde in 7.2 min ausgewaschen.

In der Gruppe der bromsubstituierten Derivate ließ sich die durch die Strophanthidin-3ß-brompropionate induzierte Kontraktur schnell auswaschen; α-SBP (t/2 = 3.5 min) (s.auch Abb.15), ß-SBP (t/2 = 4.6 min). SBA nahm mit einer Halbwertszeit von 8.7 min eine Mittelstellung ein. Von allen geprüften Substanzen war die durch SBC hervorgerufene Kontraktur am langsamsten reversibel: t/2 = 138.4 min.

Vergleicht man die Zeiten, innerhalb derer 9o% des toxischen Effektes abgeklungen waren (Abb.15), ergeben sich die gleichen Tendenzen.

Beim SP waren 9o% der entwickelten Kontraktur nach ca. 13 min aufgehoben, SA (= 23.8 min) hatte eine mittlere Auswaschgeschwindigkeit, während mehr als 2 Stunden bis zur 9o%igen Eliminierung der durch SC induzierten Kontraktur benötigt wurden.

In der Gruppe der bromsubstituierten Strophanthidinderivate ist dieselbe Reihenfolge zu beobachten.

Bei α- und ß-SBP ließen sich 9o% des toxischen Effektes innerhalb von 11.5 bzw. 16.8 min auswaschen. SBA hatte eine mittlere Abklingquote mit 29.6 min. 6o% der Versuche mit SBC zeigten nach 3 Stunden noch eine Restkontraktur von mehr als 4o%, die jedoch abnehmende Tendenz hatte, während 4o% der Versuche volle Reversibilität des toxischen Effektes aufwiesen. Da die kurzen Auswaschzeiten der Propionate eventuell auf eine Hydrolyse der Substanzen in der Tyrodelösung beruhen könnten, wurde nach Beendigung der Versuche die Cardenolid-haltige Tyrodelösung mit Chloroform extrahiert und dünnschichtchromatographisch untersucht. Es konnte kein Hinweis auf eine entsprechende Veränderung der Strophanthidinderivate gefunden werden.

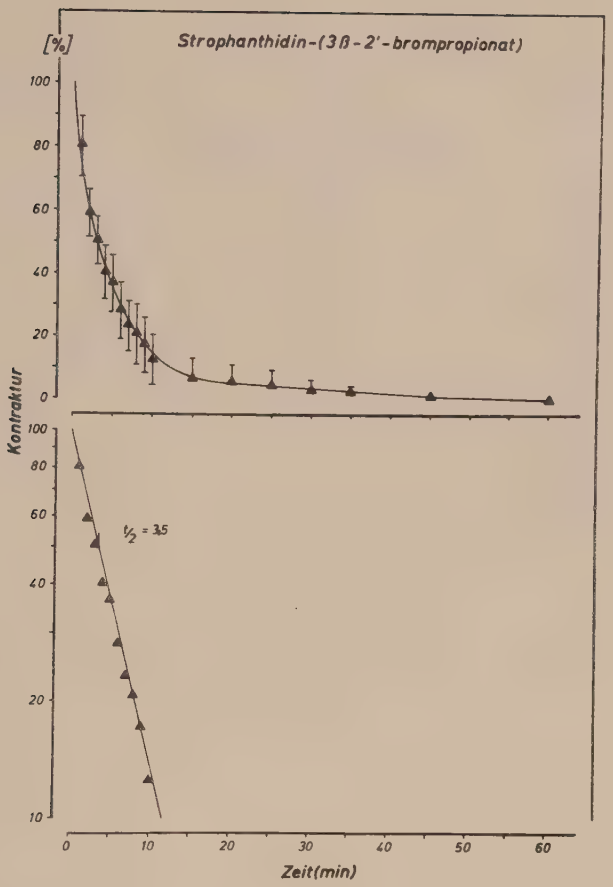


Abb. 15

Prozentuale Abnahme (Ordinate) des toxischen Effektes (Kontraktur) von α -SBP in pharmakonfreier Tyrodelösung in Abhängigkeit von der Zeit (Abszisse, Angabe in Min.).
Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen der Mittelwerte von 5 Versuchen.

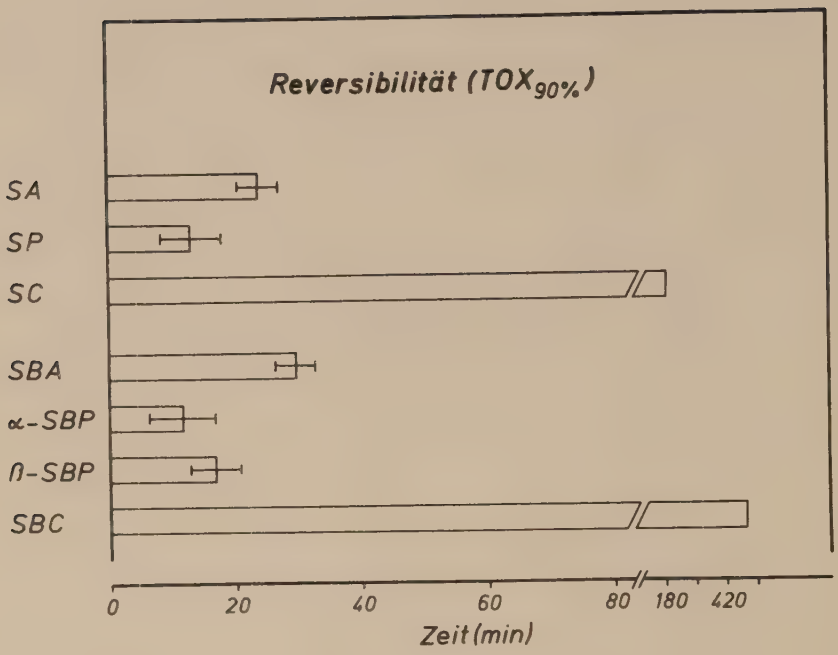


Abb.16

Abklinggeschwindigkeit des toxischen Effektes (Kontraktur) der angegebenen Strophanthidinderivate (Ordinate). Dauer (Abszisse, Angabe in Min.) bis zur Elimination von 90% der substanzinduzierten Kontraktur (TOX 90%). Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen der Mittelwerte von je 5 Versuchen.

Substanz	Konz. ($x10^{-5}$M)	A: Invasion Zeit (T) min (1)	(2)	B: Evasion T/2 (min)
SA	8	24.0 ± 3.7	16.8 ± 4.8	7.2 ± 0.9
SP	8	28.0 ± 3.4	18.0 ± 2.4	4.7 ± 1.5
SC	4	22.0 ± 2.0	16.0 ± 2.3	63.4 ± 8.5
SBA	16	40.0 ± 2.2	27.0 ± 1.2	8.7 ± 1.0
α-SBP	16	22.0 ± 2.6	14.2 ± 1.9	3.5 ± 1.2
β-SBP	4	37.0 ± 6.6	23.8 ± 2.4	5.8 ± 1.3
SBC	16	39.1 ± 3.5	19.4 ± 3.1	138.4 ± 20.5

Tabelle 11:

Entwicklung und Elimination der Cardenolid-induzierten Kontraktur.
A: Zeit in Minuten bis zur Entwicklung einer Kontrakturhöhe von 200 mp (Invasion) nach Zugabe (1) der angegebenen Konzentrationen der genannten Substanzen, (2) nach Kontrakturbeginn
B: Halbwertszeit (t/2) der Rückbildung der Kontraktur in cardenolidfreier Tyrodelösung (Evasion)
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus jeweils 5 Versuchen.

3.4. Einfluß der Strophanthidinderivate auf die Na^+-K^+-aktivierbare ATPase

3.4.1. Dosis-Wirkungsbeziehung

Die Enzymaktivität der myokardialen ATPase wurde bei Anwesenheit von Mg^{2+}-,K^+-,Na^+-Ionen (= Gesamtaktivität) mit 25.4 $\pm$ 1.2 µmol P/mg Prot x Std. (n=22) bestimmt. Waren nur Mg^{2+}-Ionen im Medium vorhanden, wurde eine Aktivität von 9.8 $\pm$ o.9 µmol P/mg Prot x Std. (n=22) ermittelt, die sich durch Zugabe von Na^+-Ionen geringfügig auf 14.o $\pm$ o.9 µmol P/mg Prot x Std. (n=22) erhöhte. Diese Na^+-induzierte Aktivitätserhöhung ist durch Herzglykoside nicht hemmbar. Für die Na^+-K^+-aktivierbare ATPase (= Transport-ATPase) ergab sich eine Aktivität von 11.4 $\pm$ 1.1 µmol P/mg Prot x Std. Sämtliche untersuchten Strophanthidinderivate hatten keinen bzw. nur einen geringfügigen hemmenden Effekt auf die Mg^{2+}-Na^+-Aktivität (max. ca. 5%). Das Lösungsmittel Dimethylformamid (DMF) zeigte in der verwendeten Konzentration von 5 µl/ml keine signifikante Änderung der ATPase-Aktivitäten. Die ermittelten Werte bei Anwesenheit von DMF betrugen:

Mg^{2+}-Na^+-K^+-ATPase-Aktivität = 24.1 $\pm$ 1.4 µmol P/mg Prot x Std. (n=22)

Mg^{2+}-Na^+-ATPase-Aktivität = 13.0 $\pm$ 0.9 µmol P/mg Prot x Std. (n = 22)

Na^+-K^+-ATPase-Aktivität = 11.1 $\pm$ 1.0 µmol P/mg Prot x Std (n = 22)

Der Einfluß der halbsynthetischen Strophanthidinderivate auf die Na^+-K^+-aktivierbare ATPase wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen $1o^{-1o}$ und $1o^{-4}$M getestet. In den niedrigen Konzentrationsbereichen konnte eine leichte Stimulierung (je nach Substanz ca. 5-2o%), durch höhere Konzentrationen eine dosisabhängige Hemmung der Enzymaktivität festgestellt werden. Die höchste Konzentration $1o^{-4}$M zeigte bei allen Derivaten eine fast vollständige Hemmung (83-99%) der Na^+-K^+-aktivierbaren ATPase.

Abb.17 zeigt die Hemmung der myokardialen Na^+-K^+-ATPase von Meerschweinchen durch steigende Konzentrationen der Strophanthidinderivate, deren Seitenkette am C_3 des Steroidgerüstes nicht bromiert ist, in Abb.18 ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung der bromsubstituierten Derivate dargestellt. Die entsprechenden Zahlenwerte sind in den Tabellen 12 und 13 aufgeführt. Zwischen SA und SP bestand kein signifikanter Unterschied in der inhibitorischen Potenz. Für SA wurde eine 5o%ige Hemmung (ID 5o) der Transport-ATPase bei einer Konzentration von $(12.5 \pm 2)x1o^{-6}$M (n=7) ermittelt, während die ID 5o von SP bei $(14.3 \pm 3.2)x1o^{-6}$M (n=8) lag. SC zeigte in dieser Gruppe die höchste Affinität: ID 5o = $(8.o \pm 2.3)x1o^{-6}$M (n=7).

Bromsubstitution an der Seitenkette des Strophanthidins verstärkt die Wirkung an der Na^+-K^+-ATPase. In dieser Gruppe waren die Konzentration für die halbmaximale Wirkung (ID 5o) von SBA (ID 5o = $(12.6 \pm 3.6)x1o^{-6}$M, n=6) und α-SBP (ID 5o = $(13.o \pm 3.3)x1o^{-6}$M, n=7) nicht signifikant verschieden. β-SBP nahm eine mittlere Stellung ein mit einer ID 5o = $4.4 \pm 1.5x1o^{-6}$M (n=8), während SBC die höchste Affinität zur Transport-ATPase aufwies: ID 5o = $1.o \pm o.3x1o^{-6}$M. Eine Übersicht über die ID 5o - Werte der Strophanthidinderivate zeigt die Tab.14.

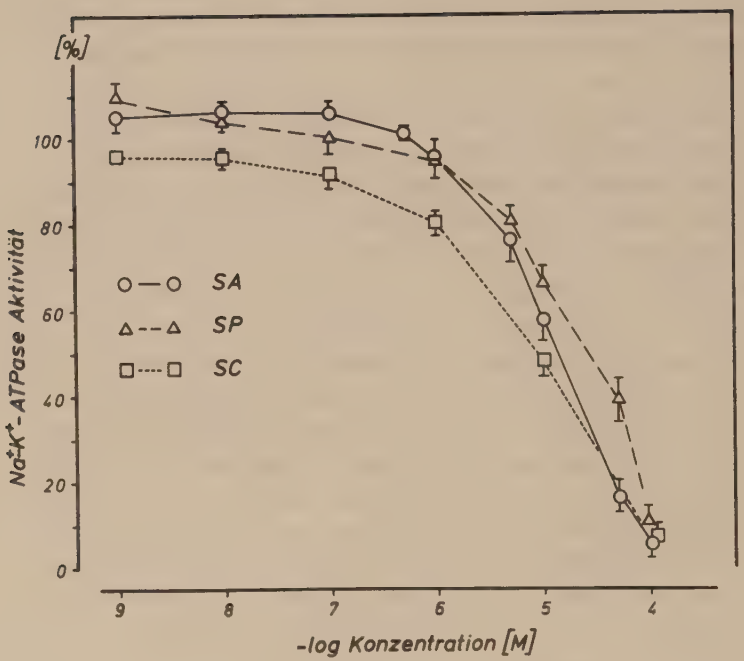


Abb.17

Einfluß steigender Konzentrationen (Abszisse, Angabe in M) der nicht bromierten Strophanthidinderivate SA, SP und SC auf die Aktivität der myokardialen Na^+-K^+-aktivierbaren ATPase (Ordinate, in %) von Meerschweinchenherzen.
Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen der Mittelwerte von 7-8 Versuchen.

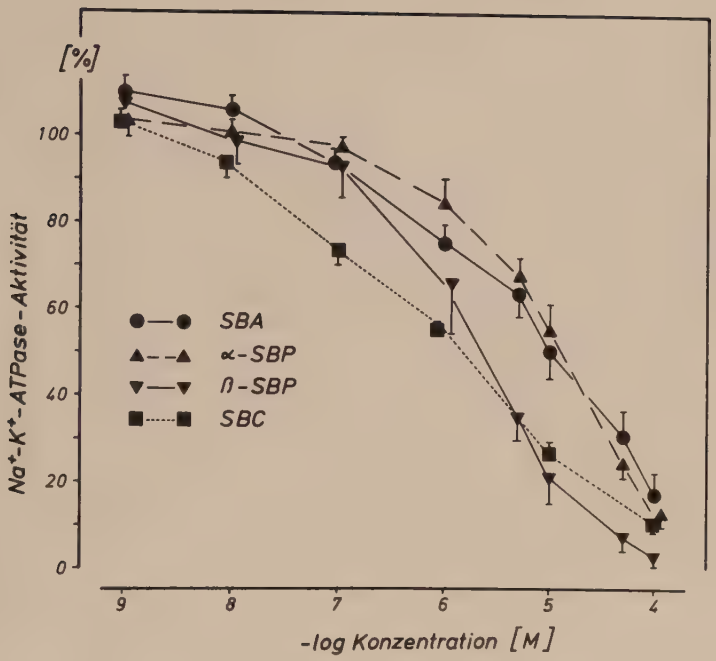


Abb.18

Einfluß steigender Konzentrationen (Abszisse, Angabe in M) der bromsubstituierten Strophanthidinderivate SBA, -SBP, ß-SBP und SBC auf die Aktivität der myokardialen Na^+-K^+-aktivierbaren ATPase (Ordinate, in %) von Meerschweinchenherzen.
Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte von 7-8 Versuchen.

KONZENTRATION (M)	SA	SP	SC
10^{-10}	105.3 ± 3.1	123.3 ± 5.6	102.6 ± 3.6
10^{-9}	106.9 ± 2.4	109.6 ± 4.2	95.8 ± 1.3
10^{-8}	106.2 ± 2.4	104.1 ± 2.1	95.5 ± 2.3
10^{-7}	106.0 ± 2.9	100.5 ± 4.1	91.4 ± 3.0
$5x10^{-7}$	100.9 ± 1.7		
10^{-6}	95.3 ± 4.4	94.2 ± 4.7	80.3 ± 2.7
$5x10^{-6}$	76.4 ± 5.2	81.0 ± 3.3	
10^{-5}	57.6 ± 4.7	66.6 ± 3.8	48.5 ± 3.7
$5x10^{-5}$	16.7 ± 3.5	39.9 ± 5.2	
10^{-4}	5.4 ± 3.2	10.6 ± 3.8	7.6 ± 3.2

Tabelle 12:

Aktivität der myokardialen Na^+-K^+-aktivierbaren ATPase in Prozent (%) bei steigenden Konzentrationen von SA (n=7); SP (n=8); SC (n=7).
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus der jeweils angegebenen Anzahl von Versuchen.

KONZENTRATION (M)	SBA	α-SBP	β-SBP	SBC
10^{-10}	112.1 ± 3.7	103.6 ± 7.0	116.5 ± 2.3	106.8 ± 7.9
10^{-9}	110.1 ± 3.9	103.8 ± 4.1	107.9 ± 3.7	102.9 ± 3.4
10^{-8}	106.2 ± 3.1	101.0 ± 2.8	99.2 ± 5.6	93.7 ± 3.1
10^{-7}	93.8 ± 3.7	98.0 ± 2.1	93.3 ± 7.2	73.7 ± 3.4
10^{-6}	75.5 ± 4.5	84.9 ± 5.5	66.2 ± 12.0	55.2 ± 1.8
$5x10^{-6}$	63.8 ± 5.3	68.1 ± 4.0	35.3 ± 5.6	
10^{-5}	50.2 ± 6.4	55.4 ± 6.0	21.4 ± 6.5	26.9 ± 2.7
$5x10^{-5}$	31.0 ± 5.6	24.5 ± 3.5	7.4 ± 3.2	
10^{-4}	17.3 ± 5.0	12.9 ± 3.6	2.9 ± 2.4	10.2 ± 1.8

Tabelle 13:

Aktivität der myokardialen Na^+-K^+-aktivierbaren ATPase in Prozent (%) bei steigenden Konzentrationen von SBA (n=7); α-SBP (n=8); β-SBP (n=8); SBC (n=8).
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus der jeweils angegebenen Anzahl von Versuchen.

SUBSTANZ	ID_{50} ($x10^{-6}M$)	N
SA	12.5 ± 2.0	7
SP	14.3 ± 3.2	8
SC	8.0 ± 2.3	7
SBA	12.6 ± 3.6	7
α-SBP	13.0 ± 3.3	7
β-SBP	4.4 ± 1.5	8
SBC	1.4 ± 0.3	8

Tabelle 14:

Konzentrationen für die halbmaximale Hemmung (ID 50) der myokardialen Na^+-K^+-ATPase durch die aufgeführten Strophanthidinderivate.
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus der jeweils aufgeführten Anzahl von Bestimmungen (n).

3.4.2. Reversibilität der ATPase-Hemmung

Durch die Modifizierung der Methode von PETERS et al. (1974) (s.2.3.4.) konnte die hemmende Wirkung der Strophanthidinderivate auf die myokardiale Na^+-K^+-ATPase bestimmt werden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Hemmbarkeit und die erzielten Hemmeffekte entsprachen den aus der Dosis-Wirkungskurve ermittelten Werten.

Wie Abb.19 zeigt, ändert sich die Stabilität des Enzym-Cardenolid-Komplexes durch Modifizierung der Seitenkette am C_3 des Strophanthidingerüstes nicht wesentlich. Wird die Seitenkette nicht bromsubstituiert, ist die Hemmung der Na^+-K^+-ATPase vollständig reversibel. Durch α-Halogen-Substitution wird der Enzym-Steroid-Komplex nur wenig, aber statistisch signifikant ($p < 0.05$) stabiler (ca. 10% Resthemmung). Findet die Bromsubstituierung der Seitenkette in ß-Stellung statt, so ist die ATPase-Hemmung dagegen voll reversibel.

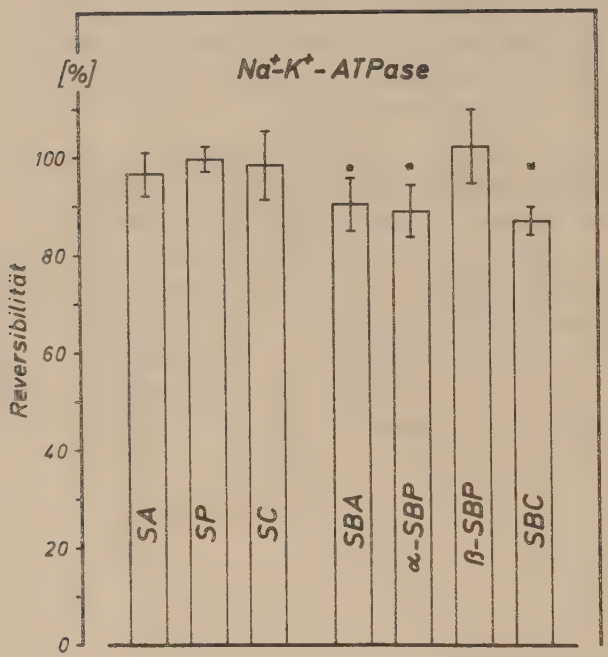


Abb. 19

Reversibilität der Hemmung des Na^+-K^+-aktivierbaren Anteils der myokardialen ATPase von Meerschweinchen in Prozent (%) durch bromsubstituierte und nicht bromierte Strophanthidinderivate gemessen mittels der Verdünnungsmethode nach PETERS et al. (1974). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen der Mittelwerte aus jeweils 6 Versuchen.

* $p < 0.05$

4. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, ein "affinity label" der Na^+-K^+-ATPase zu finden (Lit.s.Einleitung). Durch irreversible Bindung einer solchen Substanz an das Enzym, das als spezifische Bindungsstelle der Herzglykoside gilt, wäre eine Möglichkeit gegeben, diese näher zu charakterisieren, sowie den Wirkort der herzwirksamen Substanzen zu bestimmen.

Als potentielle "affinity label" wurden Strophanthidinderivate synthetisiert, deren Hydroxylgruppe am C_3 des Steroidgerüstes mit Carbon- oder Bromcarbonsäuren im Sinne einer Kettenverlängerung verestert wurde. Diese Kettenverlängerung sollte die Lipophilie der Substanzen erhöhen, und entsprechend der Hypothese von PORTIUS und REPKE (1964), eine bessere Anlagerung der Cardenolide an den Rezeptor bewirken.

Eine an der Seitenkette substituierte alkylierende Gruppe (Brom) sollte dadurch leichter mit einer nucleophilen Gruppe des Enzyms unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren können. Durch Messung der Reversibilität der Na^+-K^+-ATPase-Hemmung durch die synthetisierten Cardenolide sowie der inotropen bzw. toxischen Wirkung dieser Substanzen sollte untersucht werden, ob die synthetisierten Strophanthidinderivate die ATPase irreversibel binden können. Die cardiotone und cardiotoxische Wirkung der Strophanthidinderivate am isolierten Meerschweinchenpapillarmuskel sowie ihre inhibitorische Wirkung an einer myokardialen Na^+-K^+-ATPase von Meerschweinchen sollte weiter Aufschluß über eine Korrelation oder mögliche Dissoziation von biologischer Wirkung und ATPase-Hemmung geben.

4.1. Einfluß der Seitenkettenverlängerung am C_3 des Strophanthidingerüstes auf die Lipophilie

Eine wichtige Rolle in der Bindung zwischen Pharmakon und Rezeptor spielt die hydrophobe Bindung. Da das Pharmakon aus dem wässrigen Milieu des Extrazellulärraumes in den lipophilen Bindungsbereich

des Rezeptors übertreten muß,gibt das Verteilungsverhalten zwischen einem wässrigen und einem organischen Lösungsmittel einen Hinweis auf diesen Prozeß.

Die hydrophoben Eigenschaften eines Stoffes werden durch einen Verteilungskoeffizienten P charakterisiert. P beschreibt das Verhältnis der Konzentrationen C_a und C_b einer Substanz in zwei sich berührenden Phasen, von denen eine lipophil und die andere hydrophil ist. Für die Simulierung der biologischen Verhältnisse erschien HANSCH und DUNN (1972) das Octanol/Wasser-System am geeignetesten. Auch die vorliegenden Werte wurden in diesem System bestimmt. Es zeigte sich, daß durch Kettenverlängerung am C_3 des Strophanthidingerüstes die Cardenolide lipophiler werden. Wird zusätzlich noch bromsubstituiert , kann ein weiteres Ansteigen der Lipophilie beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen von COHEN et al. (1978), die u.a. auch eine Erhöhung der Lipophilie bei Veränderung von Seitengruppen des Steroidgerüstes beschrieben.

4.2. Wirkung der Strophanthidinderivate am isolierten Meerschweinchenpapillarmuskel

Nach PORTIUS und REPKE (1964) wird der positiv inotrope Effekt der Herzglykoside durch die "Wirk- bzw. Haftgruppe" der Substanzen bestimmt. Da diese bei den untersuchten Strophanthidinderivaten übereinstimmen, unterscheiden sie sich wenig in ihrer Wirkungsbreite und dem maximal inotropen Effekt (intrinsic activity). Die Veränderung der "Hilfsgruppe" durch Kettenverlängerung und Bromsubstitution äußert sich, wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, in einer Affinitätsänderung der Cardenolide zum Rezeptor bzw. zum isolierten Organ. Ein Vergleich der ED 5o-Werte der untersuchten Strophanthidinderivate läßt erkennen, daß durch eine Verlängerung der Seitenkette um nur eine Methylgruppe die Dosis-Wirkungskurve in den Bereich höherer Konzentrationen verschoben wird, während weitere Kettenverlängerung zu einer Affinitätsverbesserung führt. Wird in einer kur-

zen Seitenkette (Acetat bzw. Propionat) Brom in α-Position zur Carboxylgruppe eingeführt, resultiert daraus eine Affinitätsverminderung, während dies in einer längeren Seitenkette (Capronat) eine gesteigerte Affinität bewirkt. Endständig substituiertes Brom (ß-SBP) entspricht einer Kettenverlängerung. Die Dosis-Wirkungskurve des Derivates befindet sich im Bereich niedrigerer Konzentrationen als die des nicht bromierten Analogons, die Affinität ist also erhöht.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, ist der Wirkungsmechanismus des positiv inotropen Effektes der Herzglykoside noch weitgehend ungeklärt. Während es allgemein anerkannt ist, daß die cardiotoxische Wirkung der Cardenolide durch die Hemmung der Na^+-K^+-ATPase ausgelöst wird (LEE und KLAUS 1971, OKITA 1977, ZAVECS und DUTTA 1977, AKERA und BRODY 1978), wird die Hypothese,daß der cardiotone Effekt dem selben Wirkungsmechanismus folgt, angezweifelt (LEE und KLAUS 1971, PETERS et al. 1974, OKITA 1977). In den vorliegenden Untersuchungen sollte ein Vergleich von Anflut- und Eliminationskinetik beider Effekte zeigen, ob ein Zusammenhang zwischen den beiden Wirkungen besteht, oder ob sie dissoziieren.

Da sowohl die cardiotone als auch die cardiotoxische Wirkung durch eine Interaktion der Herzglykoside mit dem spezifischen Rezeptor ausgelöst wird, läßt sich aus der Anflutkinetik beider Effekte u.a. erkennen, wie sich die Veränderung des Substituenten am C_3 des Steroidgerüstes auf die Affinität der Substanzen zum Rezeptor auswirkt.

Durch Verlängerung der Seitenkette wird die Lipophilie der Cardenolide erhöht (s.4.2.). Sie können sich leichter an den Rezeptor anlagern, und die Anheftung durch Wasserstoffbrückenbildung zwischen Carbonylgruppe der Steroidseitenkette und dem

Rezeptor wird begünstigt. Wird Brom in α-Position zur Carboxylgruppe eingeführt, wird diese Reaktion erschwert. Die - bromsubstituierten Strophanthidinderivate haben längere Anflutzeiten des positiv inotropen Effektes als ihre nicht bromierten Analoga, obwohl mit Bromsubstitution die Lipophilie ansteigt. In ß-Stellung substituiertes Brom hindert den Anheftungsprozeß nicht. Die ß-Substitution ist im Sinne einer Kettenverlängerung zu interpretieren.

Anders als der cardiotone Effekt der Strophanthidinderivate entwickelte sich der toxische Effekt (Kontraktur). Schon SCHOLZ (1969) und SEIBEL und REITER (1973, 1974) hatten das Kontrakturverhalten von Meerschweinchenpapillarmuskeln und -vorhöfen untersucht. Die dort durch Änderung des Kaliummilieus in der Nährlösung induzierten Kontrakturen erreichten schnell ein Maximum, während in den vorliegenden Versuchen die durch Cardenolidüberdosierung induzierte Kontraktur sich bei den einzelnen Muskelpräparaten und Substanzen so unterschiedlich entwickelten, daß zum besseren Vergleich eine bestimmte Kontrakturhöhe (2oo mp) festgelegt wurde. Die Geschwindigkeit der Kontrakturentwicklung war bei den nicht bromierten Derivaten des Strophanthidins trotz steigender Kettenlänge und erhöhter Lipophilie nahezu identisch. Bromsubstitution verzögerte dagegen die Cardenolid-induzierte Intoxikation (Kontraktur). Eine Ausnahme bildete die durch α-SBP hervorgerufene Kontraktur, die sich genauso schnell wie die der nicht bromierten Derivate entwickelte. Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, ist die Anflutkinetik der cardiotoxischen Wirkung von Herzglykosiden im Gegensatz zu der positiv inotropen nicht von der Lipophilie der Strophanthidinderivate abhängig. Hieraus läßt sich schließen, daß entweder bei einem Cardenolidüberangebot in der Lösung Unterschiede in der Anlagerungsgeschwindigkeit nicht mehr meßbar sind, oder aber daß die beiden Effekte durch Bindung an verschiedene Rezeptoren zustande kommen.

Auch die Kinetik der Elimination cardiotoner bzw. cardiotoxischer Effekte sollte weitere Hinweise auf eine mögliche Dissoziation von positiv inotroper und toxischer Wirkung der Herzglykoside geben. Außerdem sollte die Reversibilität dieser Effekte zeigen, ob es gelungen war, mit den vorliegenden Strophanthidinderivaten ein "affinity label" zu synthetisieren. Die positiv inotrope Wirkung war in der Gruppe der nicht bromierten Strophanthidinderivate schnell reversibel (Tab.9, Abb.14).

Dennoch vergrößerte sich die Haftung am Papillarmuskel mit Verlängerung der Seitenkette, d.h. Erhöhung der Lipophilie. Wenn nach YODA (1973) die Ablösung des Cardenolids vom Rezeptormolekül von der Zuckergruppe her beginnt, lassen sich die Ergebnisse damit erklären, daß die lipophileren Substanzen stärkere Bindungen ausbilden können.

Durch Bromsubstitution in α-Stellung zur Carboxylgruppe der Seitenkette verlängerten sich die Eliminationszeiten des positiv inotropen Effektes. Der biphasische Verlauf der Auswaschkurven von SBA und α-SBP (Ta.9, Abb.1o) kann eventuell so gedeutet werden, daß zuerst Rezeptoren gebunden werden, die leicht zugänglich an der Membranoberfläche liegen (SBA ca. 3o%, α-SBP ca. 55%). Wenn diese abgesättigt sind, können in einem nachgeschalteten Prozeß die Strophanthidinderivate mit kurzer bromierter Seitenkette Rezeptoren besetzen, die in schwerer zugänglichen Kompartimenten liegen (SBA = ca. 7o%, α-SBP = 45%). Vergleicht man den prozentualen Anteil der an den beiden Kompartimenten haftet, werden mit zunehmender Kettenlänge (Lipophilie) beide Kompartimente gleichzeitig besetzt (paralleler Prozeß). Der monophasische Verlauf der Auswaschkinetik von SBC (Tab.1o, Abb.12) kann damit erklärt werden, daß auf Grund der längeren Seitenkette zwischen diesen beiden Kompartimenten nicht mehr differenziert werden kann. Wird nur die Haftung der bro-

mierten Strophanthidinderivate an den leicht zugänglichen Rezeptoren berücksichtigt, so steigt diese mit zunehmender Kettenlänge. Das Cardenolid, dessen Seitenkette in β-Stellung bromsubstituiert ist (β-SBP), verhält sich wie das nicht bromierte Analogon. Der biphasische Verlauf der Auswaschkurve von SBA steht im Einklang mit Ergebnissen von FRICKE und KLAUS (1971).

Von der Überlegung ausgehend, daß der cardiotoxische Effekt von Herzglykosiden mit der ATPase-Hemmung direkt korreliert (s.o.), und daher eine durch ein "affinity label" der ATPase induzierte toxische Wirkung irreversibel sein sollte, wurde die Eliminationskinetik des toxischen Effektes der halbsynthetischen Strophanthidinderivate bestimmt.

Die Rückbildung der Kontraktur in pharmakonfreier Tyrodelösung verlief bei den Propionaten am schnellsten, während die Acetate eine mittlere Eliminationsgeschwindigkeit aufwiesen. Die beiden Capronate hafteten am stärksten am isolierten Organ bzw. dem spezifischen Rezeptor; der toxische Effekt war erst nach mehreren Stunden vollständig reversibel.

Wie schon bei der Anflutkinetik der toxischen Wirkung läßt sich auch hier erkennen, daß die Haftung des Cardenolids am Rezeptor durch Verlängerung der Seitenkette am C_3 des Steroidgerüstes nicht in jedem Fall verbessert wird, während Bromsubstitution der Seitenkette (mit Ausnahme des α-SBP) die Festigkeit des Cardenolid-Rezeptor-Komplexes erhöht. Die Reversibilität des toxischen Effektes weist darauf hin, daß der Rezeptor (ATPase) durch die bromierten Strophanthidinderivate nicht irreversibel alkyliert werden konnte.

4.3. ATPase-Hemmung und ihre Reversibilität durch Strophanthidinderivate als potentielle Alkylantien

Einige Autoren (Übersicht LEE und KLAUS 1971) stellten bei niedrigen Cardenolidkonzentrationen eine Stimulierung der Na^+-K^+-

ATPase-Aktivität fest. Diese Stimulierung der ATPase in den Konzentrationsbereichen von 10^{-10} bis 10^{-8}M konnte auch in den vorliegenden Versuchen beobachtet werden. Die Hypothese, daß die inotrope Wirkung der Cardenolide auf einer Stimulierung (PALMER et al. 1966, PETERS et al. 1974) beruht, während die cardiotoxische Wirkung auf eine Hemmung der ATPase zurückzuführen ist, konnte in den vorliegenden Versuchen nicht bestätigt werden, da die Stimulierung nur geringfügig ausgeprägt und zudem uneinheitlich war. Hinzu kommt, daß Konzentrationen, die am isolierten Organ einen positiv inotropen Effekt auslösten, in den in vitro Versuchen ausschließlich hemmend auf die Na^+-K^+-ATPase wirkten.

Vergleicht man die Struktur der synthetisierten Strophanthidinderivate mit ihrer Affinität zum Enzym, lassen sich folgende Abhängigkeiten ableiten: Strophanthidinderivate mit kurzen Seitenketten (Acetat und Propionat) und deren α-bromsubstituierte Analoga zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Affinität zur Na^+-K^+-ATPase. Wird die Seitenkette durch Methylgruppen (SC, SBC) oder endständiges Brom (ß-SBP) weiter verlängert, ergibt sich eine höhere Affinität zum Enzym. Bei steigender Länge der am C_3 des Strophanthidins eingeführten Seitenkette löst auch deren α-Bromsubstitution eine Affinitätssteigerung zu der Na^+-K^+-ATPase aus. Da durch Synthese der Strophanthidinderivate ein "affinity label" der Na^+-K^+-ATPase gefunden werden sollte, wurde die alkylierende Potenz der Derivate in einem in-vitro-System und die Reversibilität der Enzymhemmung an einer myokardialen Na^+-K^+-ATPase untersucht. Nach HOKIN et al. (1966) entstand ein "affinity labeling" der Hirn-ATPase von Meerschweinchen durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den halbsynthetischen Strophanthidinderivaten und nucleophilen Gruppen des Enzyms. Diese Reaktion sollte durch einen in vitro-Versuch mit Herzglykosiden und Cystein nachvollzogen werden. Die Ergebnisse beim physiologischen pH 7.4 zeigen, daß nur SBA in der erwarteten Weise reagierte, während die

Reaktionsfähigkeit mit zunehmender Kettenlänge rasch abnahm. Die Alkylierungsreaktion läuft nach einem SN_2-Mechanismus ab, in dem sich die nucleophile Sulfhydrylgruppe an das elektropositive Kohlenstoffatom anlagert und gleichzeitig Brom abgespalten wird. Durch die Einführung einer Methylgruppe (oder mehrerer) wird diese Reaktion einmal sterisch stark gehindert, zum andern trägt der induktive Effekt der Methylgruppe zum Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit bei. Aus der Erhöhung des pH-Wertes der Reaktionslösung (pH 9.o) resultiert eine Ionisierung der Sulfhydrylgruppe und erleichtert dadurch die Ausbildung der kovalenten Bindung.

Die Abnahme der Sulfhydrylgruppenkonzentration der Kontrolle läßt sich durch Dehydrierung des Cysteins zum Cystin erklären, die in Gegenwart von Luftsauerstoff eintritt.

Vergleicht man diese Versuche mit der Reversibilität der durch die Strophanthidinderivate induzierten Na^+-K^+-ATPase-Hemmung, so ergab sich keine Übereinstimmung. Obwohl sich SBA in seiner Reaktionsfähigkeit mit Cystein von den längerkettigen bromsubstituierten Derivaten stark unterschied, waren alle Derivate reversibel an die ATPase gebunden. Die α-bromierten Derivate zeigten nur eine unwesentlich bessere Haftung als die nicht bromsubstituierten. Wird Brom in β-Stellung zur Carboxylgruppe an der Seitenkette substituiert, verhielt sich das Strophanthidinderivat wie die nicht bromsubstituierten Analoga. Die vorliegenden Daten bestätigen die Ergebnisse von FRICKE und KLAUS (1971a), TOBIN et al. (1973) und PETERS et al. (1974), wonach SBA die myokardiale Na^+-K^+-ATPase nicht irreversibel hemmt. Die Kettenverlängerung führte zwar zu einer verbesserten Anheftung an das Enzym, es gelang jedoch nicht, ein alkylierendes Agens zu schaffen.

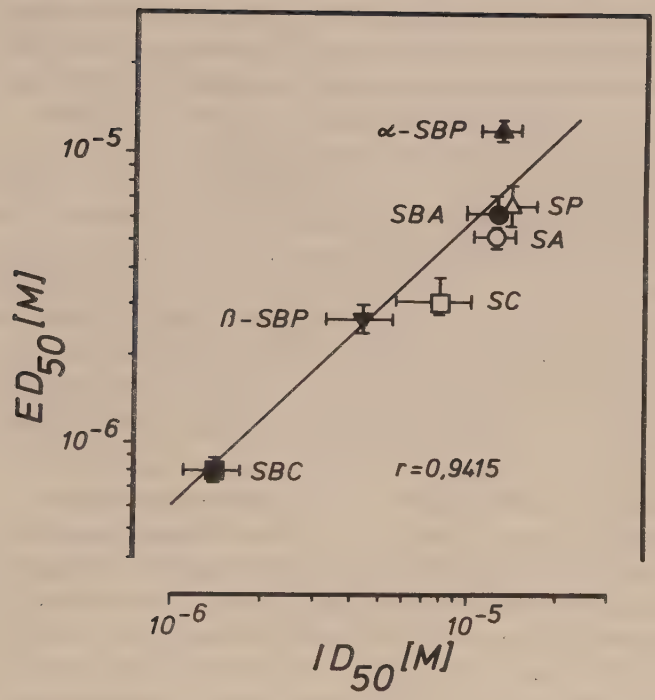


Abb.2o

Vergleich der Na^+-K^+-ATPase-Hemmung (ID 5o) durch die nicht bromierten und bromsubstituierten Strophanthidinderivate (Ordinate, Angabe in M) und ihrer positiv inotropen Wirkung (ED 5o) am Meerschweinchenpapillarmuskel (Abszisse, Angabe in M).
Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen der Mittelwerte aus jeweils 7-9 Versuchen.

4.4. Schlußbetrachtung

Die Hypothese REPKES (1963), daß die Hemmung der Na^+-K^+-aktivierbaren ATPase den positiv inotropen Effekt der Cardenolide auslöst, wurde in letzter Zeit sowohl bestätigt (ERDMANN und SCHONER 1974, HAUSTEIN und HAUPTMANN 1974, SCHWARTZ 1976, AKERA und BRODY 1978, FLASCH und HEINZ 1978) als auch abgelehnt (PETERS et al. 1974, RHEE et al. 1976, FRICKE 1976, OKITA 1977). BRODY (1974) sowie FLASCH und HEINZ (1978) stellten eine Korrelation zwischen der positiv inotropen Wirkung und der Hemmung der Na^+-K^+-ATPase-Aktivität auf, die FLASCH und HEINZ (1978) übernahmen, indem sie die halbmaximalen Effekte der beiden Wirkungen miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieser Autoren konnten in den vorliegenden Versuchen bestätigt werden; es besteht eine direkte Korrelation zwischen ED 5o und ID 5o - Werten (Abb.2o) der halbsynthetischen Strophanthidinderivate, die auf eine Beteiligung der ATPase am Zustandekommen der inotropen Wirkung hinweist.

Aus der Korrelation kann jedoch eine unmittelbare Abhängigkeit der positiv inotropen Wirkung von der ATPase-Hemmung, wie sie AKERA und BRODY (1978) formulierten, allerdings nicht abgeleitet werden, da die Hypothese, daß die myokardiale Na^+-K^+-ATPase an dem Transport der Cardenolide durch die Zellmembran beteiligt ist (FRICKE 1976), auch durch eine solche Korrelation nicht auszuschließen ist. Da die Na^+-K^+-ATPase auch im Falle eines Herzglykosid-Transportes durch die Zellmembran primärer Angriffspunkt der Cardenolide ist, muß bei genügend hoher Cardenolidkonzentration (ab ca. $1x1o^{-7}M$) eine Hemmung der Na^+-K^+-ATPase durch die Besetzung der spezifischen Bindungsstellen des phosphorylierten Konformationszustandes E_a-P resultieren.

Die halbmaximale Hemmung der ATPase (ID 5o) kann im speziellen Fall der Herzglykoside als Maß für die Affinität dieser Substanzen zur Na^+-K^+-ATPase gelten, da in dieser Pharmakongruppe keine Substanz bekannt ist, die eine hohe Affinität zum Rezeptor aufweist.

ohne eine biologische Wirkung zu zeigen. Wie ein Vergleich von ID 5o und Verteilungskoeffizient P zeigt, war die Affinität nicht nur von den lipophilen Eigenschaften der Derivate abhängig, was das Vorliegen einer spezifischen Rezeptor-Cardenolid-Bindung bestätigt. Unterschiede in der Affinität zur Na^+-K^+-ATPase konnten nur von den C_3-Substituenten am Steroidgerüst ausgehen, da nur diese bei den halbsynthetischen Derivaten variierten.

Die vorliegenden Daten bestätigen das Postulat von WILSON et al. (1970) daß die Struktur des C_3-Substituenten für die Bildung des Rezeptor-Cardenolid-Komplexes wichtig ist, und sie nicht nur als Hilfsgruppe im Sinne von PORTIUS und REPKE (1964) angesehen werden kann. Für die Erklärung der cardiotonen und cardiotoxischen Wirkung der Cardenolide gibt es zwei Hypothesen. TSIEN et al. (1977) u.a. führen beide biologischen Effekte auf denselben Wirkungsmechanismus zurück, wobei der toxische Effekt eine Steigerung der inotropen Wirkung darstellt, während OKITA (1977) zwei voneinander unabhängige Wirkungsmechanismen vermutete. Die Unterschiede in der Auswaschkinetik von inotropen und toxischen Effekten in den vorliegenden Versuchen deuten darauf hin, daß - wie bereits von OKITA (1977) formuliert - die Effekte durch Bindung an zwei verschiedene Rezeptoren zustande kommen. Die Hypothese von RHEE et al. (1976), daß der toxische Effekt eher mit einer ATPase-Hemmung korreliert als die inotrope Wirkung, kann durch die vorliegenden Versuche allerdings weder bestätigt noch abgelehnt werden.

OKITA et al. (1973) versuchten diese Frage zu klären, indem die Reversibilität der Cardenolid-induzierten positiv inotropen Wirkung an isolierten Herzen mit der ATPase-Aktivität in denselben Präparaten verglichen wurde. Diese Versuche könnten so erweitert werden, daß nicht nur das Verhalten von cardiotonen, sondern auch das von cardiotoxischen Cardenolidkonzentrationen auf das isolierte Organ und die ATPase gleichzeitig untersucht würden.

Aus eigenen in vitro Versuchen läßt sich nur entnehmen, daß die ATPase-Aktivität in toxischen Konzentrationsbereichen stärker gehemmt wird als in inotropen. Die volle Reversibilität der toxischen Wirkung der halbsynthetischen Strophanthidinderivate und der durch diese Substanzen induzierten Hemmung der Na^+-K^+-ATPase zeigt, daß die Verlängerung der Seitenkette zwar eine bessere Anlagerung der Derivate an das Enzym zur Folge hat, eine Alkylierung der Na^+-K^+-ATPase aber nicht resultiert. Eine Erklärung für die volle Reversibilität der ATPase-Hemmung durch die bromierten Derivate, die im gewissen Gegensatz zu der in-vitro-Alkylierung (Cystein) steht, könnte durch Untersuchungen von SKOU (1965) gegeben sein. Danach vermindert die Anwesenheit von ATP im Inkubationsmedium die Hemmung der ATPase aus Rinderhirn durch SH-Gruppen-blockierende Substanzen (z.B. N-Äthylmaleinimid). SKOU (1965) erklärte dies mit einer "Schutzwirkung" von ATP gegenüber dem Angriff dieser Substanzen.

Abschließend kann gesagt werden, daß die vorliegenden Ergebnisse die Vermutung bestätigen, daß durch Kettenverlängerung am C_3 des Strophanthidingerüstes eine bessere Haftung am isolierten Organ und eine Affinitätssteigerung erreicht werden kann. Erfolglos blieb jedoch der Versuch, durch bromsubstituierte Derivate die Na^+-K^+-ATPase irreversibel zu binden und so ein "affinity label" des Enzyms zu finden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Um ein "affinity label" der Na^+-K^+-ATPase zu finden, wurden analog der Synthese von HOKIN et al. (1966) durch Veresterung der 3-OH-Gruppe des Strophanthidins bromsubstituierte und nicht bromsubstituierte Derivate hergestellt.

Die Lipophilie der halbsynthetischen Strophanthidinderivate (als Verteilungskoeffizient P im Octanol/Wasser-System gemessen) vergrößerte sich durch steigende Kettenlänge und Bromsubstitution. SA ($P = 9.5 \pm 0.6$), SBA ($P = 13.2 \pm 1.6$), SP ($P = 18.0 \pm 2.3$), SC ($P = 21.1 \pm 1.1$), SBC ($P = 24.2 \pm 0.7$), (n=5).

Die alkylierenden Eigenschaften der bromsubstituierten Strophanthidinderivate wurde durch die Reaktionsfähigkeit mit der Sulfhydrylgruppe des Cysteins bei pH 7.4 und 9.0 bestimmt; SBA war bei beiden pH-Werten das stärkste Alkylans, während die Reaktionsfähigkeit der übrigen Derivate mit steigender Kettenlänge rasch abnahm.

Am isolierten Papillarmuskel wurden die cardiotone und cardiotoxische Wirkung der halbsynthetischen Strophanthidinderivate untersucht:

a) positiv inotrope Wirkung

Kettenverlängerung verschiebt im allgemeinen die Dosis-Wirkungskurve in niedrigere Konzentrationsbereiche:

SA ($ED\ 50 = 5.2 \pm 0.4 \times 10^{-6}M$) (n=8)
SP ($ED\ 50 = 6.6 \pm 0.9 \times 10^{-6}M$) (n=7)
SC ($ED\ 50 = 3.1 \pm 0.6 \times 10^{-6}M$) (n=8)

Bromsubstitution erhöht in der Regel die Affinität, steigende Kettenlänge führt auch bei den bromsubstituierten Derivaten zu einer verbesserten Wirkung:

SBA ($ED\ 50 = 6.3 \pm 1.0 \times 10^{-6}M$) (n=8)
α-SBP ($ED\ 50 = 12.1 \pm 2.0 \times 10^{-6}M$) (n=9)
β-SBP ($ED\ 50 = 2.7 \pm 0.6 \times 10^{-6}M$) (n=7)
SBC ($ED\ 50 = 0.8 \pm 0.07 \times 10^{-6}M$) (n=8)

b) Anflut- und Auswaschkinetik des positiv inotropen Effektes

Die Halbwertzeiten der Invasion nahmen mit Kettenverlängerung sowohl bei den nicht bromierten als auch bei den bromierten Derivaten ab, α-Bromsubstitution verlängerte die Anflutgeschwindigkeit des positiv inotropen Effektes im Vergleich zu den nicht-substituierten Analoga.

SA ($t/2 = 6.0 \pm 0.9$ min), SP ($t/2 = 5.4 \pm 0.8$ min),
SC ($t/2 = 4.1 \pm 0.3$ min), SBA ($t/2 = 10.3 \pm 0.7$ min),
α-SBP ($t/2 = 7.9 \pm 0.7$ min), SBC ($t/2 = 6.6 \pm 0.7$ min),
β-SBP ($t/2 = 4.4 \pm 0.6$ min) (n=7-8)

Die Halbwertzeiten für die Elimination des positiv inotropen Effektes nahmen in der Gruppe der nicht bromierten Derivate mit steigender Kettenlänge zu:

SA ($t/2 = 4.0 \pm 0.9$ min), SP ($t/2 = 5.2 \pm 1.5$ min),
SC ($t/2 = 6.0 \pm 1.0$ min) (n=6-8)

Wurde die Seitenkette am C_3 des Steroidgerüstes bromsubstituiert, verlief die Auswaschkinetik bei SBA und α-SBP biphasisch:

SBA ($t/2$ (1) $= 1.5 \pm 0.3$ min), $t/2$ (2) $= 26.7 \pm 4.4$ min),
α-SBP ($t/2$ (1) $= 2.3 \pm 0.3$ min), $t/2$ (2) $= 28.3 \pm 3.5$ min) (n=8)

Die Elimination des positiv inotropen Effektes von SBC ($t/2 = 12.6 \pm 3.5$ min) und β-SBP ($t/2 = 4.5 \pm 0.9$ min) (n=7-8) verlief monophasisch.

c) Anflut- und Auswaschkinetik des toxischen Effektes (Kontraktur)

Vergleicht man die Zeit, in der eine definierte Kontrakturhöhe (200 mp) erreicht wurde, ergeben sich innerhalb der bromierten Derivate keine signifikanten Unterschiede:

SA ($t = 24.0 \pm 3.7$ min), SP ($t = 28.0 \pm 3.4$ min),
SC ($t = 22.0 \pm 2.0$ min) (n=7-8)

Bromsubstitution verzögert in der Regel die Entwicklung der Kontraktur.

SBA ($t = 4o.o \pm 2.2$ min), α-SBP ($t = 22.o \pm 2.6$ min),
ß-SBP ($t = 37.o \pm 6.6$ min), SBC ($t = 39.1 \pm 3.5$ min) (n=7-8)

Die Eliminationsgeschwindigkeit des toxischen Effektes war nicht direkt von der Kettenverlängerung und der Bromsubstitution abhängig. Alle Propionate ließen sich schnell eliminieren.

SP ($t/2 = 4.7 \pm 1.5$ min), α-SBP ($t/2 = 3.5 \pm 1.2$ min),
ß-SBP ($t/2 = 5.8 \pm 1.3$ min).

Die Acetate nahmen eine Mittelstellung ein:
SA ($t/2 = 7.2 \pm o.9$ min), SBA ($t/2 = 8.7 \pm 1.o$ min).

Die längste Abklingrate der Kontraktur wiesen die Capronate auf:
SC ($t/2 = 63.4 \pm 8.5$ min), SBC ($t/2 = 138.4 \pm 2o.5$ min).

Die Hemmung der Na^+-K^+-ATPase durch die halbsynthetischen Strophanthidinderivate wurde an einer mikrosomalen ATPase aus Meerschweinchenherzen geprüft. In der Gruppe der nicht bromierten Derivate hatte SC (ID 5o: $3.1 \pm o.6 \times 1o^{-6}$M) den größten, SP (ID 5o: $6.6 \pm o.9 \times 1o^{-6}$M) den geringsten Hemmeffekt. SA (ID 5o: $5.2 \pm o.4 \times 1o^{-6}$M) nahm eine Mittelstellung ein. Die bromsubstituierten Derivate wiesen folgende Reihenfolge auf:

α-SBP (ID 5o: $13.o \pm 3.3 \times 1o^{-6}$M), SBA (ID 5o: $12.6 \pm 3.6 \times 1o^{-6}$M),
ß-SBP (ID 5o: $4.4 \pm 1.5 \times 1o^{-6}$M), SBC (ID 5o: $1.4 \pm o.3 \times 1o^{-6}$M).

Auf die Mg^{2+}-Na^+-Aktivität hatten die halbsynthetischen Strophanthidinderivate keinen Einfluß.

Die Reversibilität der durch Strophanthidinderivate induzierten Hemmung einer myokardialen Na^+-K^+-ATPase erwies sich als vollständig. Sie betrug je nach Substanz zwischen 87 und 1o2%:

SA : 96.6 ± 4.7%; SP : 99.6 ± 2.6%; SC : 98.5 ± 6.9%;
SBA : $9o.4 \pm 5.2$%; α-SBP: $89.o \pm 5.3$%; SBC : 86.9 ± 2.9%;
ß-SBP: $1o2.4 \pm 7.5$%.

Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen wurden u.a. folgende Punkte zur Diskussion gestellt.

1. Die Korrelation zwischen positiv inotroper Wirkung und Hemmung der myokardialen Na^+-K^+-ATPase der untersuchten Strophanthidinderivate weist auf eine Beteiligung der ATPase an der inotropen Wirkung hin.

2. Die unterschiedlichen Zeitverläufe der Elimination von cardiotoner und cardiotoxischer Wirkung lassen auf die Existenz zweier voneinander unabhängiger Wirkunsgmechanismen schließen.

3. Durch die Veränderung des C_3-Substituenten des Strophanthidingerüstes durch Kettenverlängerung und Bromsubstitution wurde zwar eine Affinitätssteigerung zum Rezeptor erreicht, es gelang jedoch nicht, ein "affinity label" der Na^+-K^+-ATPase zu entwickeln.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ABRAMSON,H.N.; J.-S.K.Cho
Inhibition of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase by cardenolide alkylating agents.
Journ.Med.Chem., 14, 5o9-511, (1971)

AKERA,T.; T.M.Brody
The role of Na^+, K^+-ATPase in the inotropic action of digitalis.
Pharmacol.Rev., 29, 187-22o, (1978)

AMADOR,E.; J.Urban
Simplified serum phosphorus analyses by continuous-flow ultraviolet spectrophotometry.
Clin.Chem., 18, 6o1-6o4, (1972)

BRODY,T.M.
Discussion paper: Ouabain-induced inhibition of cardiac (Na^+-K^+-) ATPase and the positiv inotropic response.
Ann.N.Y.Acad.Scienc., 242, 684-687, (1974)

COHEN,E.; H.Flasch; N.Heinz; F.W.Hempelmann
Verteilungskoeffizienten und Rm-Werte von Cardenoliden.
Arzneim.Forsch. 28 (II), 2179-2182, (1978)

DUNHAM,E.T.; J.M.Glynn
Adenosine triphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions.
J.Physiol., 156, 274-293, (1961)

DUTTA,S.; S.Goswami; J.O.Lindower; B.H.Marks
Subcellular distribution of digoxin-H^3 in isolated guinea pig and rat hearts.
J.Pharmacol.exp.Ther., 159, 324-334, (1968a)

DUTTA,S.; S.Goswami; O.K.Datta; J.O.Lindower; B.H.Marks
The uptake and binding of six radiolabeled cardiac glycosides by guinea pig hearts and by isolated sarcoplasmatic reticulum.
J.Pharmacol.exp.Ther., 164, 1o-21, (1968b)

EBASHI,S., M.Endo
Calcium ion and muscle contraction
Progr.Biophys.Molec.Biol., 18, 123-183, (1968)

EIBL,H.J.; W.C.Lands
A new sensitive determination of phosphate.
Anal.Biochem., 3o, 51-57, (1969)

ELLMAN.,G.L.
Tissue sulfhydryl goups.
Arch.Biochem.Biophys., 82, 7o-77, (1959)

ERDMANN,E.; W.Schoner
Eigenschaften des Rezeptors für Herzglykoside.
Klin.Wochenschr., 52, 7o5-718, (1974)

FLASCH,H.; N.Heinz
Correlation between inhibition of (Na^+-K^+)-membrane-ATPase and positive inotropic activity of cardenolides in isolated papillary muscles of guinea pig.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 3o4, 37-44, (1978)

FORBUSH III, B.; J.H.Kaplan; J.F.Hoffman
Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na^+-K^+-ATPase
Biochemistry, 17, 3667-3676, (1978)

FRICKE,U.; H.G.Gerber; W.Klaus; U.Wollert
Vergleich der subzellulären Verteilung von ^{3}H-Strophanthin und ^{3}H-Digitoxin in Meerschweinchenherzen.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.exp.Pathol., 263, 266-267 (1969)

FRICKE,U.; W.Klaus
Die Reversibilität der Wirkung von Digitoxin, Strophanthidin und Strophanthidin-3-bromacetat am Papillarmuskel und einer mikrosomalen Na^+-K^+-aktivierbaren ATPase des Meerschweinchens.
Experientia, 25, 685-686, (1969)

FRICKE,U.; W.Klaus
Die Haftung verschiedener Cardenolide am Papillarmuskel und einer mikrosomalen ATPase des Meerschweinchenherzens.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 268, 2oo-2o9, (1971a)

FRICKE,U.; W.Klaus
Über die Wirkung von Strophanthidin-3-bromacetat am Papillarmuskel des Meerschweinchens.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 192-199, (1971b)

FRICKE,U.; W.Klaus
A simple preparation technique for a microsomal Na^+-K^+-activated ATPase from cardiac tissues of different species
Prep.Biochem., 4, 13-29, (1974)

FRICKE,U.
Neuere Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus der Herzglykoside.
Fortschr.d.Med., 94, 1837-1845, (1976)

HAFNER,D.; E.Heinen; E. Noack
Mathematical analysis of concentration-response relationships.
Arzneim.Forsch., 27, 1871-1873, (1977)

HANSCH,C.; W.J.Dunn III
Linear relationships between lipophilic character and biological activity of drugs.
J.Pharmaceut. Scienc., 61, 1-19, (1962)

HAUSTEIN,K.O.; J.Hauptmann
Studies on cardioactive steroids.
II. Structure-activity relationships in the isolated guinea-pig heart.
Pharmacol., 11, 129-138, (1974)

HOKIN,L.E.; M.Mokotoff; S.M.Kupchan
Alkylation of a brain transport adenosin triphosphatase at the cardiotonic steroid site by Strophanthidin-3-holoacetates.
Proc.Nat.Acad.Sci., 55, 797-804, (1966)

KLAUS,W.
Funktionsabhängige Elektrolytverschiebungen im Herzen.
Triangel, 1o, 131-138, (1971)

KLAUS,W.; U.Fricke
Electrolyt-dependence of cardiac-glycoside action at the cellular and subcellular level.
Rec.Adv.Stud.Card.Struct.Metabol., 11, 393-399, (1978)

LEE,K.S.; W.Klaus
The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides.
Pharmacol.Rev., 23, 193-261, (1971)

LEWBART,M.C.; W.Wehrli; T.Reichstein
Die Cardenolide von Gangronema gazense (S.Moore Bullock)
Helv.Chim.Act., 46, 509-517, (1963)

LOWRY,O.H.; N.J.Rosebrough; A.L.Farr; R.J.Randall
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.Biol.Chem., 193, 265-275, (1951)

LÖLLMANN,H.; T.Peters
Action of cardiac glycosides on the excitation-contraction coupling in heart muscle.
Progr.Pharmacol., 2, 1-53, (1979)

OKITA,G.T.; F.Richardson; B.F.Roth-Schechter
Dissociation of the positive inotropic action of digitalis from inhibition of sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase.
J.Pharmacol.exp.Ther., 185, 1-11, (1973)

OKITA,G.T.
Dissociation of Na^+-K^+-ATPase inhibition from digitalis inotropy.
Fed.proc., 36, 2225-223o, (1977)

PALMER,R.F.; K.Lasseter; S.L.Melvin
Stimulation of Na^+ and K^+ dependent adenosine triphosphatase by ouabain.
Arch.Biochem.Biophys., 113, 629-633, (1966)

PETERS,T.; R.-H.Raben; O.Wassermann
Evidence for a dissociation between positive inotropic effect and inhibition of the Na^+-K^+-ATPase by ouabain, cassaine, and their alkylating derivates.
Eur.J.Pharmacol., 26, 166-174, (1974)

PORTIUS,H.; K.Repke
Versuch einer Analyse der Beziehungen zwischen chemischer Struktur und Digitalis-ähnlicher Wirksamkeit auf der Rezeptorebene.
Arzneim.Forsch., 14, 1o73-1o77, (1964)

PORTIUS,H.J.; K.R.H.Repke
Eigenschaften und Funktion des Na^+-K^+-aktivierten Mg^{2+}-abhängigen Adenosintriphosphat Phosphohydrolase Systems des Herzmuskels.
Acta biol.med.germ., 19, 9o7-938, (1967)

POST,R.L.; C.R.Merritt; C.R.Kinsolving; C.D.Albrighte
Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte.
J.Biol.Chem., 235, 1796, (196o)

POST,R.L.; S.Kume; T.Tobin; B.Orcutt; A.K.Sen
Flexibility of an active center in sodium - plus - potassium adenosine triphosphatase.
J.Gen.Physiol., 54, 3o6-326, (1969)

REPKE,K.; H.Portius
Über die Identität der Ionenpumpen-ATPase in der Zellmembran des Herzmuskels mit einem Digitalis-Rezeptorsystem.
Experientia, 19, 452-458, (1963)

RESCIGNO,A.; G.Segre
Drug and tracer kinetics
Blaisdell Publishing Comp., Waltham, Mass., Toronto, London
4-23, (1966)

RHEE,H.M., S.Dutta; B.H.Marks
Cardiac Na^+-K^+-ATPase activity during positive inotropic and toxic actions of ouabain.
Eur.J.Pharmacol., 37, 141-153, (1976)

ROTH-SCHECHTER,B.; G.Okita; R.E.Thomas; F.F.Richardson
On the positive inotropic action of alkylating bromoacetates of Strophanthidin and Strophantidol-(19 H^3).
J.Pharmacol.exp.Ther., 171, 13-19, (197o)

RUOHO,A.; L.Hokin
Hellebrigenin-3-haloacetates: potent site directed alkylators of transport adenosinetriphosphatase.
Science, 159, 1354-1355, (1968)

RUOHO,A.; J.Kyte
Photoaffinity labeling of ouabain-binding site of (Na^+-K^+)-adenosinetriphosphatase.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 71, 2352-2356, (1974)

SCHATZMANN,H.-J.
Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrocytenmembran.
Helv.Physiol.Acta, 11, 346-354, (1953)

SCHOLZ,H.
Über die Wirkung von Calcium und Natrium auf die Kalium-Kontraktur isolierter Meerschweinchenvorhöfe.
Pflüger's Arch., 3o8, 315-332, (1969)

SCHOLZ,H.
Über Unterschiede im Kontrakturverhalten bei Ventrikel- und Vorhofpräparaten aus Warmblüterherzen.
Pflüger's Arch., 312, 63-81, (1969)

SCHWARTZ,A.
A sodium- and potassium- stimulated adenosin triphosphatase from cardiac tissue.
I. Preparations and properties.
Biochim.Biophys.Res.Comm., 9, 3o1-3o6, (1962)

SCHWARTZ,A.; G.M.Lindenmayer; J.C.Allen
The sodium-potassium adenosine-triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects.
Pharmacol.Rev., 27, 3-134, (1975)

SCHWARTZ,A.
Is the cell membrane Na^+-K^+-ATPase enzyme system the pharmacological receptor for digitalis?
Circ.Res., 39, 2-7, (1976)

SEIBEL,K.; M.Reiter
Biphasic contracture of guinea-pig cardiac ventricular muscle.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 28o, 295-314, (1973)

SEIBEL,K.; M.Reiter
Differentiation of inotropic mechanism by experiments on cardiac contractures.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 286, 65-82, (1974)

SKOU,J.C.
The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves.
Biochim.Biophys.Acta, 23, 394-4o1, (1957)

SKOU,J.C.
Further investigations on a Mg^{2+} and Na^+ activated adenosine triphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane.
Biochim.Biophys.Acta, 42, 6-23, (196o)

SKOU,J.C., C.Hilberg
The effect of some sulfhydryl-blocking reagents and of urea on the Na^+-K^+-activated enzyme system .
Biochim.Biophys.Acta, 11o, 359-369, (1965)

SKOU,J.C.
Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membranes.
Physiol.Rev., 45, 596-617, (1965)

SNEDECOR,G.W.; W.G.Cochran
Statistical methods 6^{th} Ed.
Iowa State Univ.Press.; Ames Iowa USA (1967)

TOBIN,T.; T.Akera; D.Ku
Reversibility of the interaction of Strophanthidin-bromoacetate with the cardiotonic steroid binding site of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase.
Mol.Pharmacol., 9, 676-685, (1973)

TOBIN,T.; H.Abramson
Irreversible inhibition of H^3-ouabain binding to Na^+-K^+-ATPase by digoxigenin-3, 12-dibromoacetate, an alkylating derivative of digoxigenin.
Eur.J.Pharmacol., 32, 243-25o, (1975)

TOBIN,T.; T.Akera; T.M.Brody; H.R.Taneja
Irreversible inhibition of Na^+-K^+-ATPase by Strophanthidin-3,5-bis-p -benzoyl benzoate, a photochemical analogue of Strophanthidin.
Res.Comm.Chem.Path.Pharmacol., 1o, 6o5-618, (1975)

TOBIN,T.; T.Akera; T.M.Brody; H.R,Taneja
Cardiotonic site directed irreversible inhibition of Na^+-K^+-ATPase by 3-azidoacetylstrophanthidin, a photochemical analogue of Strophanthidin.
Eur.J.Pharmacol., 35, 69-76, (1976)

TSIEN,R.W.; R.Weingart; W.J.Lederer; R.S.Kass
On the inotropic and arrhythmogenic effects of digitalis.
in Myocardial Failure,(Rieker ed.), pp.331-343, Berlin Springer (1977)

WILSON,W.E.; W.L.Sivitz; L.T.Hanna
Inhibition of calf brain membranal sodium- and potassium dependent adenosine triphosphatase by cardioactive sterols.
Mol.Pharmacol., 6, 449-459, (197o)

ZAVECZ,J.H.; S.Dutta
The relationship between Na^+-K^+-ATPase inhibition and cardiac glycoside-induced arrhythmia in dogs.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 297, 91-98, (1977)

YODA,A.
Structure-activity relationships of cardiotonic steroids for the inhibition of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase.
Mol.Pharmacol., 9, 51-6o, (1973)

Herrn Prof.Dr.med.W.Klaus danke ich für die Überlassung des Themas.
Herrn Priv.Doz.Dr.rer.nat.U.Fricke gilt mein besonderer Dank für die theoretische und praktische Anleitung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 12.4.1950 wurde ich als Tochter des Prof.Dr.H.W.Herrmann und seiner Frau Brigitte,geb.Glass,in Bonn geboren.
Von April 1956 bis April 1960 besuchte ich die Martin-Luther-Schule in Bonn. Ostern 1960 wechselte ich auf die Clara-Schumann-Schule über,wo ich 1968 auf dem neusprachlichen Zweig das Abitur machte. Von Juli 1968 bis Juli 1970 absolvierte ich in der Marktapotheke in Gummersbach das Apothekenpraktikum,das ich 1970 mit dem Vorexamen abschloß.
Nach zwei Semestern Biologiestudium an der Universität Bonn,begann ich im Wintersemester 1971 an derselben Universität das Pharmaziestudium und legte 1974 den ersten,1975 den zweiten Teil des Staatsexamens ab. Im August 1975 bekam ich die Approbation zum Apotheker.
Nachdem ich sechs Monate in der Hofapotheke in Köln beschäftigt war,arbeite ich seit November 1975 an meiner Dissertation am Pharmakologischen Institut der Universität köln unter Leitung von Herrn Prof.Dr.W.Klaus.